Mannhold, Raimund
Diss. Düsseldorf
1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535714_0011

Aus dem Physiologischen Institut,
Lehrstuhl für Klinische Physiologie
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. R. Kaufmann)

KALZIUMANTAGONISTEN VOM TYP DER ALIPHATISCHEN AMINE UND STRUKTURVERWANDTE HERZAKTIVE PHARMAKA

Untersuchungen zur pharmakologischen und zur physikalisch-chemischen Charakterisierung

Habilitationsschrift
der
Hohen Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf
zur Erlangung der venia legendi
vorgelegt von
Raimund Mannhold

Referent: Prof. Dr. R. Kaufmann

1. Korreferent: Prof. Dr. K. Greeff

2. Korreferent: Prof. Dr. J. O. Arndt

Tag der Habilitation: 2.12.1982

Erteilung der Venia Legendi: 20.1.1983

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	DIE QUALITATIVE UND DIE QUANTITATIVE STRUKTUR-WIRKUNGSANALYSE	4
1.2.	DAS WIRKPRINZIP CA-ANTAGONISMUS	12
1.3.	ZUR CHEMIE UND PHARMAKOLOGIE DER UNTERSUCHUNGSSUBSTANZEN	27
1.4.	DIE ZIELVORSTELLUNGEN ZU DEN VORLIEGENDEN UNTERSUCHUNGEN	37
2.	METHODEN	38
	BIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	
2.1.	DIE ERFASSUNG KONTRAKTILER EIGENSCHAFTEN AM PAPILLARMUSKEL	38
2.1.1.	Die Präparation der Papillarmuskeln	38
2.1.2.	Das Versuchsbad und die muskelmechanischen Arbeitsbedingungen	38
2.1.3.	Der Muskelhebel und die Wegmeßeinrichtung	40
2.1.4.	Die Lösungen	41
2.1.5.	Die experimentellen Ansätze	42
2.2.	DIE UNTERSUCHUNG DER ZELLULÄREN VERTEILUNG MIT HILFE DER LAMMA-ANALYSE	43
	PHYSIKALISCH-CHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN	
2.3.	DIE HANSCH-ANALYSE	46
2.3.1.	Die molekularpharmakologische Bedeutung	46
2.3.2.	Die Substituentenparameter	53
2.3.2.1.	Elektronische Substituentenparameter	54
2.3.2.2.	Sterische Substituentenparameter	56
2.3.2.3.	Lipophile Substituentenparameter	57
2.3.3.	Die mathematischen und statistischen Grundlagen	61
2.3.3.1.	Die multiple lineare Regressionsanalyse	61
2.3.3.2.	Das Normierungsverfahren für Substituentenparameter	63

		Seite
2.3.3.3.	Die statistischen Tests	65
2.3.3.4.	Die Kriterien für die Beurteilung von Regressionsgleichungen	66
2.4.	DIE MONOPOL-BINDUNGSPOLARISIERBARKEITS-METHODE	68
2.5.	DIE BESTIMMUNG VON R_M-WERTEN MIT DER PHASENUMKEHR-DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE	76
2.6.	DIE pK_a-WERTBESTIMMUNG DURCH POTENTIOMETRISCHE MIKROTITRATION	78
2.7.	DIE MESSUNG DER SUBSTITUENTEN-POLARISIERBARKEIT	81
2.8.	DIE BESTIMMUNG DES MOLEKULAREN DIPOLMOMENTS	83
3.	E R G E B N I S S E	85
	WIRKQUALITÄT	
3.1.	DIE NEGATIV INOTROPE HERZWIRKUNG	85
3.1.1.	Die Wirkung der razemischen Verbindungen	85
3.1.2.	Die Wirkung der Enantiomere	96
	WIRKORT	
3.2.	DIE R_M-WERTE DER UNTERSUCHUNGSSUBSTANZEN	103
3.3.	DIE AMPLITUDEN-FREQUENZBEZIEHUNG UNTER DEM EINFLUSS VON QUATERNISIERUNGS-PRODUKTEN	106
3.4.	DIE ZELLULÄRE LOKALISATION DER UNTERSUCHUNGSSUBSTANZEN	109
	WIRKFORM	
3.5.	DIE pK_a-WERTE DER UNTERSUCHUNGSSUBSTANZEN	111
	DIE STRUKTUR-WIRKUNGSANALYSE VON VERAPAMIL	
3.6.	DIE QUALITATIVE STRUKTUR-WIRKUNGS-ANALYSE VON VERAPAMIL	113
3.7.	DIE QUANTITATIVE STRUKTUR-WIRKUNGS-ANALYSE VON VERAPAMIL	122

		Seite
3.7.1.	Die Polarisierbarkeit und das Dipolmoment verapamilanaloger Benzolderivate	122
3.7.2.	Die Ergebnisse der HANSCH-Analyse	126
3.7.3.	Die Ergebnisse mit dem Monopol-Bindungspolarisierbarkeitsverfahren	134
4.	D I S K U S S I O N	143
4.1.	DIE WIRKQUALITÄT	143
4.2.	DER WIRKORT	150
4.3.	DIE WIRKFORM	156
4.4.	DIE STRUKTUR-WIRKUNGSANALYSE	159
5.	Z U S A M M E N F A S S U N G	169
6.	L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	174
7.	A N H A N G	194
7.1.	CA-ANTAGONISTEN UND STRUKTURVERWANDTE PHARMAKA	194
7.2.	VERAPAMILDERIVATE	198
7.2.1.	Ringabwandlungsprodukte	198
7.3.	QUATERNISIERUNGSPRODUKTE	200
7.4.	SUBSTANZEN FÜR DIE LAMMA-ANALYSE	202
7.5.	BENZOLDERIVATE	203

1. E I N L E I T U N G

Die molekulare Pharmakologie versucht, Pharmakoneffekte auf der Grundlage von Wechselwirkungen zwischen Arzneistoffmolekülen einerseits und funktionellen Strukturen lebenden Materials andererseits zu beschreiben und exakt zu analysieren. Als derartige funktionelle Strukturen können umschriebene Teilbereiche von Enzymen, Enzymsystemen, Membranbestandteilen oder auch Komponenten des genetischen Apparates fungieren. Diese biologischen Wechselwirkungspartner für Arzneistoffmoleküle werden als Rezeptoren bezeichnet, wenn die Wechselwirkung zwischen den beteiligten Molekülen zu strukturellen Veränderungen führt, die als biologische Antwort gemessen werden können. In allen anderen Fällen heissen die Bindungsstellen "sites of loss" (FASTIER, 1962), Akzeptoren (CHAGAS, 1962) oder "silent receptors".

Ziel molekularpharmakologischer Untersuchungen ist es, die Wechselwirkungen zwischen Pharmaka und Rezeptoren zu charakterisieren und zu quantifizieren sowie den Ort dieser Wechselwirkung zu lokalisieren. Ergebnisse von allgemeiner Gültigkeit und Aussagekraft sind hier nur zu erwarten, wenn eine Vielzahl essentieller Voraussetzungen zur Ableitung solcher Aussagen erfüllt ist.

In der Definition des Molekularpharmakologen basiert die spezifische Arzneistoffwirkung auf einer chemischen Reaktion zwischen Molekülen bzw. definierten Molekülbestandteilen. Die Charakterisierung und Quantifizierung von Arzneistoff-Rezeptor-Wechselwirkungen erfolgt daher im Grunde aus der Kenntnis von Art und Ausmaß der Bindungskräfte zwischen den reagierenden Molekülen. Hierzu sind gültige Aussagen nur dann möglich, wenn ein Höchstmaß an Information über die chemischen Eigenschaften der nicht reagierenden Moleküle vorliegt. Insbesondere seien der räumliche Aufbau des Moleküls (→ Röntgenstrukturanalyse, quantenchemische Rechenverfahren), die

Ladungsverteilung im Molekül (→CNDO-Analyse) sowie das Fett/Wasser-Verteilungsverhalten genannt. Erweiterte Kenntnisse aus neuen theoretischen und experimentellen Ansätzen der physikalischen Chemie und der Quantenchemie erlauben es uns heute, Strukturparameter auch für kompliziertere Arzneistoffmoleküle exakt zu bestimmen.

Ebenso bedeutend ist es auf der anderen Seite, die biologischen Aktivitätsparameter möglichst präzise zu definieren und zu ermitteln. Als wesentliche Meßgrößen dienen die Arzneistoffkonzentration, der zugehörige Effekt und die Zeit. Die Arzneistoffkonzentration in der sogenannten Biophase (→Rezeptorkompartiment) entspricht umso genauer der applizierten Dosis, je "wirkortnäher" das benutzte biologische Testmodell ist. D.h., bei einfachen "in-vitro"-Systemen (z.B. Hemmung eines isolierten Enzyms) wird die Einstellung der Wirkstoffkonzentration am Rezeptor nur sehr wenig oder gar nicht von kinetischen Größen wie Absorption, Metabolismus u.s.w. beeinflußt und kann daher der applizierten Dosis gleichgesetzt werden. Unter den bisher genannten Voraussetzungen läßt sich dann in einem dosisvariablen Meßsystem diejenige Arzneistoffkonzentration ermitteln, die in einem dosisempfindlichen Bereich der Dosis-Wirkungskurve einen standardisierten biologischen Effekt ausübt. Es wurden zahlreiche Modellvorstellungen entwickelt, um die so erhaltenen Dosis-Wirkungskurven auf der Grundlage von Arzneistoff-Rezeptor-Wechselwirkungen zu interpretieren. Dabei reichen die Vorstellungen von linearen Beziehungen zwischen Rezeptorbesetzung und beobachtetem Effekt (CLARK, 1926) über die Sparrezeptortheorie von STEPHENSON (1956) bis hin zur Theorie von PATON (1961), der den Meßeffekt mit der Geschwindigkeit der Rezeptorbesetzung korreliert.

Unabhängig von der jeweiligen Verknüpfung zwischen Rezeptorbesetzung und Meßeffekt, versucht der Molekularpharmakologe,

mit verschiedenen Ansätzen Erkenntnisse über die Molekularstruktur von Rezeptoren zu gewinnen.

Korrelationen zwischen der biologischen Aktivität einer Reihe von Abwandlungsprodukten mit den chemischen Eigenschaften dieser Derivate erlauben es, die Bindungskräfte zu definieren, die für die Bildung des Wirkstoff-Rezeptor-Komplexes verantwortlich sind (siehe HANSCH-Analyse, 2.3). Berechnungen der Wechselwirkungsenergie zwischen Arzneistoffderivaten und Modellrezeptorstrukturen tragen dazu bei, die chemischen Eigenschaften von Bindungsstellen aufzuklären (siehe Monopol-Bindungspolarisierbarkeits- Methode, 2.4).

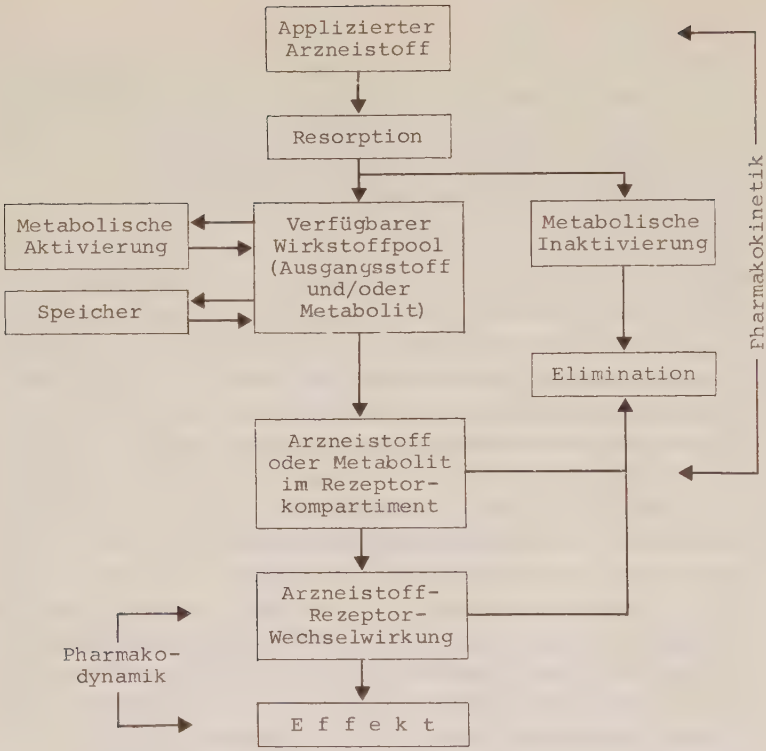
1.1. DIE QUALITATIVE UND DIE QUANTITATIVE STRUKTUR-WIRKUNGS-ANALYSE

Die britischen Forscher CRUM-BROWN und FRASER (1869) erkannten als erste den fundamentalen Zusammenhang, daß die biologische Wirkung von Arzneistoffen eine Funktion ihrer chemischen Eigenschaften darstellt. Seit dieser Geburtsstunde molekular-pharmakologischer Forschung konnten die Kenntnisse über die Arzneistoffwirkung einerseits und die Charakterisierung der chemischen Moleküleigenschaften andererseits ständig erweitert und verfeinert werden. Dadurch wurde es möglich, den funktionellen Zusammenhang zwischen biologischen und chemischen Parametern auf einer rationalen Basis qualitativ und quantitativ zu analysieren. Ein erstes Ergebnis dieser Bemühungen war die Unterscheidung zwischen strukturspezifischen und strukturunspezifischen Pharmaka. Diese Zweiteilung pharmakologischer Wirkprinzipien berücksichtigt folgende generelle Unterschiede:
Bei strukturunspezifischen Pharmaka determinieren im wesentlichen physikalisch-chemische Substanzeigenschaften wie Wasserlöslichkeit, Fettlöslichkeit, pK-Wert oder Redoxpotential die biologische Wirkung. Strukturunspezifische Arzneistoffe wirken im allgemeinen in relativ hohen Dosen; die gleiche biologische Wirkung kann von Stoffen unterschiedlicher chemischer Struktur ausgelöst werden. Die biologische Wirkung ist relativ unempfindlich gegen strukturelle Molekülmodifikationen. Bekannte Beispiele für Stoffgruppen mit strukturunspezifischer Wirkung sind Inhalationsnarkotika und Hypnotika.

Grundlage einer strukturspezifischen Wirkung ist eine chemische Wechselwirkung mit definierten Strukturen biologischen Materials (= Rezeptoren). Strukturspezifische Pharmaka wirken daher in relativ niedrigen Konzentrationen; eine bestimmte Wirkung kann nur von Pharmaka mit ähnlichen Strukturmerkmalen ausgelöst werden und leichte Molekülmodifikationen

können zu beträchtlichen Veränderungen des biologischen Effektes führen. Das Prinzip der strukturspezifischen pharmakologischen Wirkung gilt für die große Mehrheit aller heute gebräuchlichen Pharmaka; nur für derartige Stoffe lassen sich Struktur-Wirkungsbeziehungen ableiten.

Die Analyse von Arzneistoffwirkungen auf den verschiedenen Organisationsstufen lebender Systeme (isolierte Zelle bis Organismus) führte zur detaillierten Kenntnis der Einzelschritte, die als komplexes Gefüge die gegenseitige Beeinflussung von Arzneistoff und Organismus charakterisieren. Schematisch sind diese Zusammenhänge in Tabelle 1 beschrieben. Hieraus wird deutlich, daß die Einzelschritte der Arzneistoffwirkung zwischen Applikation und Effekt in pharmakokinetische (= Wirkung des Organismus auf den Arzneistoff) und pharmakodynamische (= Wirkung des Arzneistoffs auf den Organismus) Prozesse untergliedert werden. Dementsprechend kann man sowohl Struktur-Pharmakokinetik- als auch Struktur-Pharmakodynamikbeziehungen ableiten. Es ergeben sich aus solchen Untersuchungen für die kinetischen und dynamischen Teilaspekte der Arzneistoffwirkung sehr differente Beziehungen zu den chemischen Eigenschaften der Pharmaka. Für das kinetische Verhalten von Arzneistoffen existieren dabei in sehr viel größerem Umfang - unabhängig vom pharmakodynamischen Profil der einzelnen Stoffe - generelle Regeln für die Abhängigkeit von den Substanzeigenschaften. So ist z.B. die Resorption ganz allgemein eine Funktion des Fett/Wasser-Verteilungsverhaltens und im Falle schwacher Säuren oder Basen zusätzlich des pK-Wertes. Eine Vielzahl von Wirkstoffen mit unterschiedlichsten dynamischen Eigenschaften bindet in Abhängigkeit von der Lipophilie über hydrophobe Wechselwirkungen an Plasmaeiweisse. Allein die chemische Struktur des Pharmakonmoleküls bestimmt die Art des Metabolismus; Benzolringe werden zur Erhöhung der Harnfähigkeit hydroxyliert und Ester aus dem gleichen Grunde hydrolysiert. Das hier angedeutete Wissen úm die strukturellen und physikochemischen



Tab. 1 : Schema der Vorgänge, die nach Gabe eines Pharmakons im Organismus ablaufen.

Grundlagen des kinetischen Arzneistoffverhaltens läßt sich heute gezielt zur Manipulation der Pharmakonwirkung einsetzen. Als ein Beispiel von vielen sei hier die Ringfluoridierung in aromatischen Molekülstrukturen genannt; bei relativ geringem Einfluß auf das dynamische Profil kann auf diese Weise die Wirkdauer eines Pharmakons durch Verhinderung von Hydroxylierungsreaktionen erheblich verlängert werden.

Über die bisher beschriebenen qualitativen Zusammenhänge hinaus ist es in letzter Zeit sogar gelungen, quantitative Beziehungen zwischen physikalisch-chemischen Pharmakoneigen-

schaften und kinetischen Parametern wie Verteilungsvolumen, Absorptions- und Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten aufzudecken. Die Arbeitsgruppe um SEIDEL (z.B. TRETTIN, 1977) konnte zeigen, daß die Serumproteinbindung und damit die Eliminationshalbwertszeit einer Reihe von Sulfonamidderivaten nahezu vollständig Lipophilie-abhängig ist. Die dynamischen Effekte (antibakterielle Wirkung) der gleichen Verbindungsreihe konnten interessanterweise ausschließlich auf elektronische Moleküleigenschaften zurückgeführt werden. Dieses Beispiel macht in anschaulicher Weise deutlich, daß eine rationale Arzneistoffentwicklung nur auf der Basis getrennter Analysen von Struktur-Pharmakokinetik- sowie Struktur-Pharmakodynamik-Beziehungen möglich ist.

Im Gegensatz zu den bisher angesprochenen Beziehungen zwischen Struktur und kinetischen Eigenschaften, die im allgemeinen globale pK- und/oder Lipophilieabhängigkeit zeigen, stellen sich Struktur-Pharmakodynamik-Beziehungen als sehr spezifische Beziehung chemisch eng verwandter Stoffklassen zu einem definierten pharmakodynamischen Wirkprofil dar. Die in derartigen Beziehungen sehr viel wichtigeren elektronischen Substituenteneigenschaften tragen der großen Bedeutung von ladungsbedingten Wechselwirkungen im Arzneistoff-Rezeptor-Komplex Rechnung. Auf die hierin angesprochenen Beiträge einzelner Substituenten zur biologischen Aktivität von Gesamtmolekülen geht der Ansatz von ARIENS (1966) zurück, Wirkstoffmoleküle in "biofunktionelle Teile" zu zerlegen, denen für die Verweildauer eines Pharmakons im Organismus definierte Funktionen für die biologische Wirkung zugeordnet werden können. Eine der wichtigsten Unterscheidungen in diesem System ist die Differenzierung in essentielle (pharmakophore) und nicht essentielle (haptophore) Molekülteile. Die ersteren stellen den aktiven Teil des Moleküls dar, der am Rezeptor eine intrinsic activity auslöst und dementsprechend eine hohe Strukturspezifität besitzt. Die letzteren tragen zum einen zur Wirkstoffanlagerung an den Rezeptor bei (→ Affinität) und darüberhinaus zum Gesamtverhalten des Arzneistoffs im Organismus (→ kinetische Disposition).

Die nicht essentiellen Molekülteile sind variabler für strukturelle Modifikationen. Aus diesen Überlegungen heraus resultieren zwei grundsätzlich unterschiedliche Ansätze im Bereich der Struktur-Pharmakodynamik-Beziehungen.

Qualitative Struktur-Pharmakodynamik-Analysen dienen dem Ziel, den pharmakophoren Molekülteil zu ermitteln. Anhand der Untersuchung systematisch abgewandelter Derivate einer Ausgangsverbindung werden die Substituenten bestimmt, die für die Qualität eines definierten biologischen Effekts verantwortlich sind. Als Bewertungskriterien dienen das experimentell gewonnene qualitative Wirkmuster und die Anstiegssteilheit der ermittelten Dosis-Wirkungskurve. Darüberhinaus erlauben derartige qualitative Analysen Aussagen über den molekularen Wirkungsmechanismus und können zur Arzneistoffoptimierung (z.B. Elimination von Nebeneffekten) beitragen. Neben der Untersuchung von Abwandlungsprodukten gehören zum methodischen Rüstzeug qualitativer Struktur-Wirkungsanalysen die Untersuchung von Enantiomeren (→ Wirkstoffselektivität bzw. -spezifität) sowie im Fall der unter Arzneistoffen sehr häufig vertretenen Stickstoffbasen die Untersuchung von Quaternisierungsprodukten (→ Wirkortanalyse) und der Versuch, die Wirkform eines Arzneistoffs entweder anhand von pK-Bestimmungen oder mit Hilfe von pH-Experimenten festzulegen.

Während die qualitative Struktur-Dynamik-Analyse der Ermittlung essentieller Strukturbereiche in Pharmakonmolekülen dient, versucht man mit Hilfe der quantitativen Struktur-Pharmakodynamik-Analyse folgenden Zielen Rechnung zu tragen:

1) Ermittlung des quantitativen Einflusses nicht essentieller Molekülteile auf die Wirkstärke von Pharmaka;

2) Minimierung der Anzahl zu synthetisierender Derivate bei gesicherter Auffindung des wirksamsten Abwandlungsprodukts.

Während der zweite Punkt im wesentlichen einen Anlaß für die industrielle Anwendung solcher quantitativer Verfahren dar-

stellt, benutzt der Grundlagenwissenschaftler diese Methoden, um einer Lösung der ersten Fragestellung näherzukommen. Die Beschränkung der Anwendung auf Derivatereihen für nicht essentielle Molekülteile (auch sekundäre Bindungsstellen genannt) hat dabei folgenden wesentlichen Grund:
Nur für solche Derivatereihen ist sichergestellt, daß die einzelnen Verbindungen ihre Wirkung durch einen identischen Wirkungsmechanismus ausüben. Stark vereinfacht läßt sich für solche Derivate dann feststellen: das Derivat D_1 hat bei einer Konzentration K_1 einen definierten biologischen Effekt, während ein Derivat D_2 den gleichen biologischen Effekt bei der Konzentration K_2 ausübt. Das Verhältnis der biologischen Effekte ist dann dem Konzentrationsverhältnis umgekehrt proprotional:

$$\frac{W_2}{W_1} = \frac{K_1}{K_2} \qquad (1.1)$$

Das Konzentrationsverhältnis kann wiederum als eine Funktion der Differenz der physikochemischen Eigenschaften der Derivate D_1 und D_2 angesehen werden:

$$\log \frac{K_1}{K_2} = f\ (\Delta \text{ physikochemische Eigenschaften}) \qquad (1.2)$$

Molekularpharmakologisch relevante Molekülparameter sind im wesentlichen hydrophobe, elektronische und sterische Eigenschaften der Pharmaka, deren exakte Quantifizierung durch moderne Methoden der physikalischen Chemie ermöglicht wurde. Daraufhin wurden verschiedene Verfahren entwikkelt, um Maß und Art der Verknüpfung zwischen quantitativen Struktur- und Wirkungsparametern zu analysieren. Die bekannteste unter all diesen Methoden ist die Lineare-Freie-Energie bezogene Multiparameter-Regressionsanalyse nach HANSCH. Das HANSCH'sche Verfahren geht aus von der Freien Energie Änderung, die mit der Bildung des Arzneistoff-Rezeptor-Komplexes verknüpft ist. HANSCH ordnet nun die Unterschiede in der Änderung der Freien Energie (ΔG) für die Arzneistoff-

Rezeptor-Wechselwirkung verschiedener Derivate einer Verbindungsreihe den unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften dieser Stoffe zu und postuliert, daß ΔG additiv in Substituentenbeiträge faktorisierbar ist (HANSCH und DEUTSCH, 1966). Basierend auf diesen Überlegungen wurde die sogenannte HANSCH-Gleichung abgeleitet:

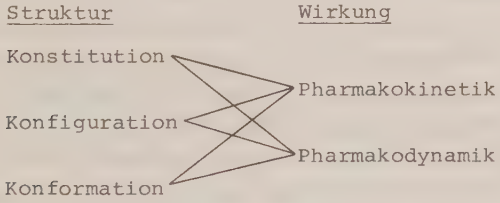
$$\log 1/C = k_1\pi + k_2\sigma + k_3E_s + k_4 \qquad (1.3)$$

Die Parameter π, σ und E_s stellen Beispiele für hydrophobe, elektronische und sterische Substituentenparameter dar; die Koeffizienten k_1 - k_4 werden mit Hilfe der multiplen Regressionsanalyse nach dem Verfahren der kleinsten Fehlerquadrate ermittelt. C repräsentiert die Arzneistoffkonzentration, die in möglichst einfachen biologischen in vitro-Testsystemen einen definierten pharmakologischen Effekt ausübt. Anstelle von C wird in HANSCH-Gleichungen der Kehrwert 1/C eingesetzt, weil auf diese Weise der wirksamsten Verbindung auch der höchste Wirkungswert zugeschrieben wird.
Die logarithmische Skalierung wird bevorzugt, weil die Wirksamkeitsunterschiede zwischen den einzelnen Mitgliedern einer Derivatereihe häufig mehrere Zehnerpotenzen überstreichen.

Es sind einige hervorragende Bücher und Übersichtsarbeiten erschienen, die den Nutzen quantitativer Struktur-Wirkungsanalysen und hier insbesondere des HANSCH-Verfahrens für das molekulare Verständnis von Arzneistoffwirkungen in eindrucksvoller Weise belegen (TUTE, 1971; KUBINYI, 1979; SEYDEL und SCHAPER, 1980). Neben dem HANSCH-Verfahren werden heute vor allem das parameterfreie de novo-Verfahren nach FREE und WILSON (1964) und halbquantitative Verfahren wie etwa das TOPLISS-Schema (TOPLISS, 1972) benutzt.

Ebenso wichtig wie die differenzierte Betrachung von Parametern, die die biologische "Wirkung" charakterisieren und quantifizieren, ist eine detaillierte Analyse unserer heutigen Möglichkeiten, die "Struktur" von Arzneistoffmolekülen zu beschreiben. Im Sinne der organischen Chemie läßt sich

die Molekülstruktur in dreierlei Weise definieren. Für alle Stoffe bekannt ist die sogenannte Konstitution. Diese legt für eine Verbindung mit gegebener Summenformel die Art und die Aufeinanderfolge der Bindungen zwischen den Atomen eines Moleküls fest. Unter der Konfiguration eines Moleküls definierter Konstitution versteht man die räumliche Anordnung der Atome um den chiralen oder starren Molekülteil. Als Konformation bezeichnet man alle räumlichen Anordnungen der Atome eines Moleküls definierter Konfiguration, die durch Drehung um Einfachbindungen erzeugt werden können. Je nach Kenntnis um die molekulare Struktur von untersuchten Pharmaka, kann man daher zwischen Konstitutions-, Konfigurations- und Konformations-Wirkungs-Analysen unterscheiden. In Deutschland werden vor allem durch die Arbeitsgruppe um MUTSCHLER und LAMBRECHT (LAMBRECHT, 1976, 1977; LAMBRECHT und MUTSCHLER, 1974) erfolgreich Konformations-Wirkungsanalysen insbesondere auf dem Gebiet zyklischer Acetylcholinanaloga durchgeführt. In einem abschließenden Diagramm sind die wesentlichen Möglichkeiten einer Verknüpfung zwischen "Struktur"- und "Wirkungs"-Parametern zusammengefaßt:



Alle hier genannten Möglichkeiten einer Beziehung zwischen der biologischen Wirkung und den chemischen Eigenschaften von Pharmaka können sowohl qualitativ als auch quantitativ abgeleitet werden.

1.2. DAS WIRKPRINZIP CA-ANTAGONISMUS

Gegen Ende der sechziger Jahre (FLECKENSTEIN et al., 1967) wurde der Ca-Antagonismus als neues Wirkprinzip in der Herz-Kreislaufpharmakologie erkannt. Die dementsprechend als Ca-Antagonisten bezeichneten Pharmaka wurden auf Grund der folgenden 4 Beobachtungen in die neue pharmakologische Stoffklasse eingereiht:

1) Zugabe ionisierten Kalziums vermag die kardiodepressiven Effekte der Untersuchungssubstanzen wieder aufzuheben;
2) die Ca^{2+}-bedingte Kontraktur in K^{+}-depolarisierten Muskelpräparationen wird durch diese Stoffe"antagonisiert";
3) Ca-Antagonisten verhindern eine Kalziumüberladung des Myokards, die experimentell z.B. durch in-vivo-Gabe hoher Dosen von Isoprenalin bewirkt wird, und
4) Verbindungen dieses Wirktyps hemmen selektiv die Ca-abhängigen Komponenten des Aktionspotentials in Herzmuskelzellen.

Die hier kurz skizzierten experimentellen Befunde von FLEKKENSTEIN und Mitarbeitern führten zur Gruppenbezeichnung "Ca-Antagonisten". Dieser Terminus ist - wie später noch zu zeigen sein wird - aus mehreren Gründen fragwürdig. Zum einen gibt diese Bezeichnung keinen Hinweis auf Wirkort bzw. -mechanismus; darüberhinaus impliziert der Begriff eine bis heute nicht erwiesene oder z.T. schon experimentell in Frage gestellte kompetitive Konkurrenzreaktion zwischen Kalzium und Pharmakon um gemeinsame Rezeptorstrukturen.
Eine der wesentlichen Determinanten, Pharmaka in diese chemisch und pharmakologisch sonst sehr heterogene Stoffklasse (siehe 1.3.) einzuordnen, ist eine Hemmwirkung auf den sogenannten langsamen Einwärtsstrom, wie sie an mehreren Herzpräparationen nachgewiesen worden ist (KOHLHARDT et al., 1972, 1976). Wir haben aus diesem Grunde anstelle der irreführenden Substanzbezeichnung "Ca-Antagonist" den präziseren Terminus "slow channel inhibitor" eingeführt (BAYER et al., 1975a;

MANNHOLD und BAYER, 1976), der inzwischen auch von anderen Autoren übernommen wurde (NAYLER und POOLE-WILSON, 1981). Ca-Antagonisten beeinflussen aber darüberhinaus - in substanzspezifisch unterschiedlichem Maße - auch andere z.T. intrazelluläre Ca-Bewegungen. In einem weitergefaßten Sinne kann man als gemeinsame Basis kalziumantagonistischer Wirkungen definieren: Durch Eingriff in transmembranäre und/oder intrazelluläre Kalziumbewegungen kontrollieren Ca-Antagonisten diejenige Kalzium-Konzentration, die zur Auslösung und Aufrechterhalung von Herz- bzw. Gefäßmuskelkontraktionen zur Verfügung steht. Die slow channel inhibitors stellen dann eine Untergruppe der Kalziumantagonisten dar. Die obige Definition macht deutlich, daß die möglichst umfassende Kenntnis all der molekularen Prozesse, die die aktuelle Konzentration kontraktionswirksamen Kalziums bestimmen, eine unabdingbare Voraussetzung für die pharmakologische Analyse kalziumantagonistischer Wirkungen an Herz und Gefäßmuskel darstellt.

Für alle Muskelsorten gilt, daß die bereits angesprochenen Kalziumbewegungen eine Mittlerfunktion zwischen der Membranerregung (→ Kontraktionsauslösung) und der kontraktilen Antwort (→ Interaktion der kontraktilen Proteine) ausüben und daher in ihrer Gesamtheit als elektromechanische Koppelung (EMK) bezeichnet werden. Verschiedene Autoren haben die Kalziumbewegungen im Rahmen der EMK in Modellen beschrieben (BASSINGTHWAIGHTE et al., 1973; BASSINGTHWAIGHTE und REUTER, 1972; CHAPMAN und NIEDERGERKE, 1970; KAUFMANN et al., 1974; BAYER, 1982). Nach den Modellvorstellungen, wie sie KAUFMANN, BAYER oder auch ADAMS und SCHWARTZ (1980) vertreten, kann man innerhalb der EMK transsarkolemmale und intrazelluläre Kalziumaustauschvorgänge unterscheiden.

Das kardiale Sarkolemm besteht aus 3 distinkten Schichten, wie die folgende Abbildung schematisch wiedergibt:

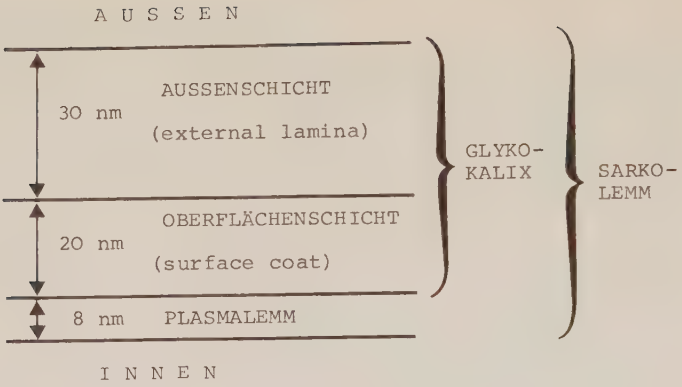


Abb. 1: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Herzmuskelzellmembran.

Die Glykokalix weist in ihrer chemischen Zusammensetzung eine Anhäufung von anionischen Mucopolysacchariden, Glykoproteinen und Sialinsäurebestandteilen auf und trägt auf diese Weise zur negativen Oberflächenladung der Membran mit bevorzugter Bindungsfähigkeit für Kationen, insbesondere Kalzium, bei. Die Glykokalix stellt somit einen potentiellen Oberflächenspeicher für Kalziumionen dar, der sich an der Außenseite des Plasmalemms befindet; das Plasmalemm ist die eigentliche Elementar-Zellmembran mit der bekannten Doppelschichtstruktur, in der eingebettet eine Vielzahl globulärer Makromoleküle mit Proteineigenschaften wie z.B. die Na^+, K^+-ATPase, die Adenylatzyklase und andere regulatorische Proteine nachgewiesen sind.

Der transsarkolemmale Konzentrationsgradient beträgt an der Herzmuskelzelle für Kalzium etwa 10000 : 1 (außen : innen). Daraus resultiert eine - allerdings vernachlässigbar kleine - Kalziumeinwärtsbewegung. Der ganz überwiegende Teil jedoch fließt während der Myokarderregung ins Zellinnere. Der Myokarderregung liegen zwei Einwärtsströme zugrunde: zum einen ein Na^+-getragener Strom, der für den schnellen Aufstrich des Aktionspotentials verantwortlich ist und sehr empfindlich auf Änderungen der extrazellulären Na^+-Konzentration reagiert; zum anderen ein hauptsächlich Ca^{2+}-getragener Strom, der für die Ausbildung der charakteristischen Plateauphase

des myokardialen AP verantwortlich ist und sehr empfindlich auf Änderungen der extrazellulären Ca^{2+}-Konzentration reagiert. Entsprechend ihrem unterschiedlichen kinetischen Verhalten bezeichnet man den Na^{+}-Strom auch als den schnellen und den hauptsächlich Ca^{2+}-getragenen Strom als langsamen Einwärtsstrom. Die charakteristischen Eigenschaften dieser Einwärtsströme sind eingehend untersucht und in Übersichtsarbeiten zusammenfassend beschrieben worden (z.B. REUTER, 1979). Die Membranpassage der Ladungsträger erfolgt durch definierte Poren oder Kanäle. Über die molekulare Zusammensetzung und den räumlichen Bau der membranären Ionenkanäle existieren bis heute nur unvollständige Kenntnisse. Wesentliche Grundbausteine stellen Proteine und Phospholipide dar. Die Eiweißnatur der Torstrukturen (gates) konnten ARMSTRONG et al. (1973) nachweisen. Ihre Untersuchungen am Tintenfischaxon zeigten, daß der Inaktivierungsmechanismus nach Pronasebehandlung selektiv unterdrückt wird. Die Aktivierungs- und Inaktivierungsstrukturen sind nach diesen Untersuchungen strukturell und funktionell distinkte Einheiten, wobei die Aktivierungsgates mehr zur Membranaußen- und das Inaktivierungsgate an der Membraninnenseite gelegen sind. Phospholipase C-Behandlung führt am Tintenfischaxon zur Verminderung der Anstiegsgeschwindigkeit und der Amplitude des Aktionspotentials. ABBOTT und Mitarbeiter (1972) haben mit diesen experimentellen Befunden auf die essentielle Bedeutung der Phospholipide für die Kanaleigenschaften hingewiesen. Determinanten der spezifischen Kanaleigenschaften sind die Permeabilität und die Exzitabilität. Die heutigen Kenntnisse zur Membranpermeabilität gehen im wesentlichen auf Untersuchungen und daraus abgeleitete Modellvorstellungen von HILLE (1975, 1976) zurück. Danach sind die Membrankanäle hydrophile Poren, mit einer geringen Weite von nur wenigen Ångström. Innerhalb des Kanals befindet sich ein als Selektivitätsfilter bezeichneter Engpaß mit Abmessungen von 3.1 x 5.1 Å. Der Selektivitätsfilter ist mit einer besonders hohen Zahl von Sauerstoffatomen ausgestattet, die die Ausbildung von Wasserstoffbrücken-

bindungen ermöglichen. Durch pH-Senkung des umgebenden Milieus werden die Kanäle blockiert; man führt dies auf die Protonierung einer Protonenbindungsstelle zurück. Auf der Basis dieser Kenntnisse hat HILLE ein Permeabilitätsmodell entwickelt, das im einzelnen folgende Schritte beinhaltet (siehe auch Abb. 2): das permeierende Kation befindet sich zunächst im weiteren Teil des Kanals und ist noch vollständig hydratisiert; bei Annäherung an die Protonenbindungsstelle verliert das Kation einen Teil seiner Hydrathülle, wobei die elektrostatische Anziehung durch die negative Ladung der Protonenbindungsstelle zu einer energetischen Stabilisierung führt. Den Selektivitätsfilter passiert das Kation dann unter Abstreifen seiner Hydrathülle und Ausbildung eines energiereichen Übergangskomplexes; bei Eintritt in den Intrazellulärraum erfolgt die Rehydratisierung des Kations. Die Differenz der Freien Energie der Hydratation und der Bindung an die Protonenbindungsstelle im Selektivitätsfilter bestimmt die energetische Selektion beim Durchtritt von Kationen durch einen bestimmten Kanal. Die Energiebarriere ist damit neben den strukturellen Eigenschaften (Dimension des Selektivitätsfilters) die zweite Grundlage für die Ionenselektivität von Membrankanälen. Die heutigen Vorstellungen zur Exzitabilität gehen zurück auf Untersuchungen von HODGKIN und HUXLEY (1952). Mit Hilfe der von ihnen eingeführten Methode der Spannungsklemme konnten sie die Zeit- und Potentialabhängigkeit der Ionenströme während des Aktionspotentials messen und durch Aufstellung entsprechender Gleichungen einer mathematischen Berechnung zugänglich machen. Für die Einwärtsströme des myokardialen AP gelten folgende Beziehungen:

$$I_{Na^+} = g_{Na} + (E_M - E_{Na^+}) \qquad (1.4)$$

$$I_{si} = g_{Ca^{2+}} + (E_M - E_{Ca^{2+}}) \qquad (1.5)$$

Die Ionenströme ergeben sich demnach quantitativ aus dem Produkt der Membranleitfähigkeit für den beteiligten Ladungsträ-

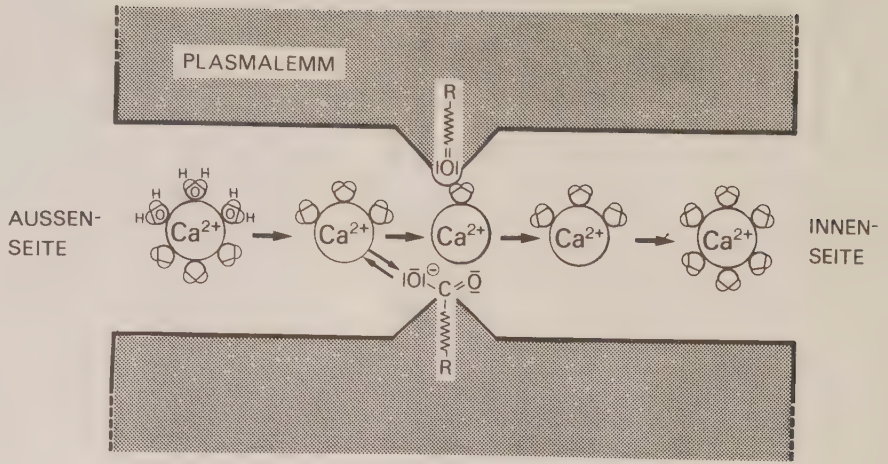


Abb. 2: Schematische Darstellung des Permeabilitätsmodells nach HILLE.

ger und der elektromotorischen Kraft; diese ergibt sich aus der Differenz zwischen Membranpotential und Umkehrpotential der jeweiligen Ionensorte. Die Leitfähigkeit hängt von der Zahl leitender Membrankanäle sowie den individuellen Kanaleigenschaften ab. HODGKIN und HUXLEY führten zur Detailanalyse der Leitfähigkeitskontrolle den Parameter der maximalen Leitfähigkeit $\bar{g}$ (alle Kanäle geöffnet) ein. Auf ihre Untersuchungen geht auch die Erkenntnis zurück, daß die Leitfähigkeit über den Ionentor- oder gating-Mechanismus sowohl Potential- (→ Anzahl der offenen Kanäle nimmt mit der Depolarisation zu) als auch Zeitabhängigkeit (→ Zeitbedarf für den Übergang geschlossenes Tor / offenes Tor) aufweist. Im einzelnen stellen sich diese Zusammenhänge wie folgt dar:
Jeder Kanal wird durch geladene Tore kontrolliert, die in zwei verschiedenen Konformationen auftreten können. In einer Position α ist das Tor geöffnet und erlaubt die Ionenleitung durch den Kanal, während der Kanal bei der Torkonformation ß blokkiert wird. Der Konformationsübergang zwischen den beiden Positionen gehorcht einer Reaktion 1. Ordnung. Die Nettogeschwindigkeit der Kanalöffnung ergibt sich wie folgt:

$$\frac{dy}{dt} = \alpha y\ (1 - y) - ßy \cdot y \qquad (1.6)$$

y : Anteil geöffneter Kanäle (Position α)
1-y : Anteil geschlossener Kanäle (Position ß)
αy : Geschwindigkeitskonstante für die Kanalöffnung
ßy : Geschwindigkeitskonstante für den Kanalblock

Die Membranleitfähigkeiten für Na^+ und Ca^{2+} lassen sich anhand dieser Gleichungssysteme beschreiben, wobei jedoch noch der Tatsache Rechnung getragen werden muß, daß die Leitfähigkeitszunahme nach Depolarisation nicht konstant bleibt, sondern nach kurzer Zeit wieder auf den Ruhewert abfällt. Dies wird als Inaktivierung des Kanals bezeichnet. Für die Natriumleitfähigkeit ergibt sich aus diesen Überlegungen:

$$g_{Na^+} = \bar{g}_{Na^+} \cdot m^3 h \qquad (1.7)$$

$$dm/dt = \alpha m \cdot (1-m) - \beta m \cdot m \qquad (1.8)$$

$$dh/dt = \alpha h \cdot (1-h) - \beta h \cdot h \qquad (1.9)$$

m ist die Variable für die Aktivierung, h diejenige für die Inaktivierung des Systems. Die angegebenen Geschwindigkeitskonstanten entsprechen der allgemeinen Gleichung (1.6). In analoger Weise ergibt sich für den langsamen Einwärtsstrom:

$$g_{Ca^{2+}} = \bar{g}_{Ca^{2+}} \cdot d \cdot f \cdot l \qquad (1.10)$$

Die Variablen d,f und l stehen entsprechend für die Aktivierung, Inaktivierung und Erholung von der Inaktivierung dieses Systems. Einzelheiten des Tormechanismus der Leitfähigkeitskontrolle sind in Abb. 3 beschrieben. Einschließlich des hier nicht näher besprochenen repolarisierenden K^+-Auswärtsstroms ergibt sich damit anhand der HODGKIN-HUXLEY-Gleichungen folgender Gesamtmembranstrom I:

$$I = C_M \cdot \frac{dE}{dt} + n^4\bar{g}_{K^+}(E_M - E_{K^+}) + m^3h\bar{g}_{Na^+}(E_M - E_{Na^+}) + d \cdot f \cdot \bar{g}_{Ca^{2+}}(E_M - E_{Ca^{2+}}) + g_L(E_M - E_L) \qquad (1.11)$$

Hierbei bedeuten C_M die Membrankapazität und E_L einen unspezifischen Leckstrom mit konstanter Leitfähigkeit (g_L).
Die Annahme separater Ionenkanäle für den schnellen und den langsamen Einwärtsstrom stützt sich auf das unterschiedliche kinetische Verhalten, die differente pH-Sensibilität und die selektive Hemmbarkeit der beiden Systeme.

Neben den bereits erwähnten Unterschieden ist noch folgende Diskrepanz zwischen den beiden Einwärtsströmen festzuhalten: Während beim schnellen Natriumstrom das experimentell ermittelte und das theoretisch anhand der Nernstgleichung berech-

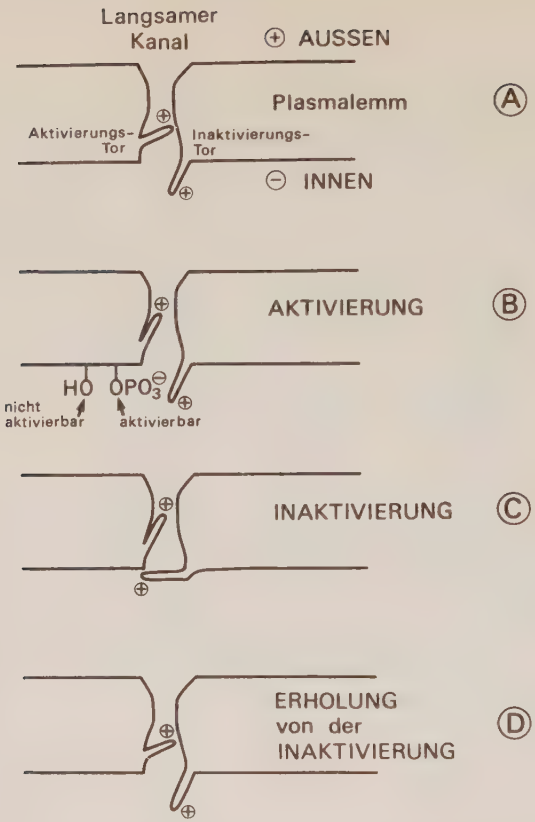


Abb. 3: Schematische Darstellung der Leitfähigkeits-kontrollierenden Prozesse in Membrankanälen (Hodgkin-Huxley-Kinetiken). Der Kanal verfügt über zwei Tore: Ein mehr an der Membranaußenseite gelegenes Aktivierungs- und ein mehr an der Membraninnenseite gelegenes Inaktivierungstor. Mit einiger Wahrscheinlichkeit tragen die Tore positive Ladungen und sind so Membranpotential-abhängig. Durch elektrostatische Anziehung ist unter Ruhebedingungen (A) das Aktivierungstor geschlossen und das Inaktivierungstor geöffnet. Bei Depolarisation (zunehmende Positivierung des Zellinneren) werden die Tore vom Zellinneren elektrostatisch abgestoßen, wobei das Aktivierungstor eine schnellere Kinetik aufweist als das Inaktivierungstor. So kann unmittelbar nach der Depolarisation Kalzium in die Zelle einströmen, da beide Tore geöffnet sind (⟶ (B)). Zeitverzögert schließt das Inaktivierungstor und unterbindet den weiteren Ioneneinstrom (⟶ (C)). Zur Wiederherstellung der Ausgangsbedingungen wird in einer Erholungsphase ((D)) das Aktivierungstor geschlossen und das Inaktivierungstor wieder geöffnet.
Die Aktivierung der Torstrukturen ist nicht nur Potential-abhängig, sondern wird darüberhinaus chemisch kontrolliert; nur phosphorylierte Kanäle sind auch aktivierbar.

nete Gleichgewichtspotential nahezu identisch sind, differieren der experimentelle (+ 40 mV) und der theoretische Wert (+ 115-120 mV) für den langsamen Einwärtsstrom ganz erheblich. REUTER und SCHOLZ (1977) konnten diesen Widerspruch auflösen, indem sie neben Ca^{2+}-Ionen Na^{+} als zweiten Ladungsträger des langsamen Einwärtsstroms bei einem Permeabilitätsverhältnis von 100 : 1 annahmen und mit Hilfe der GOLDMANN'schen constant-field-Gleichung experimentelle und theoretische Werte in Einklang bringen konnten. Der langsame Einwärtsstrom beträgt nach Untersuchungen von REUTER (1979) 4-6 µA. 200 µA wären erforderlich, wenn der langsame Einwärtsstrom die einzige Quelle zur Bereitstellung kontraktionswirksamen Kalziums für eine volle kontraktile Aktivierung darstellen sollte. Hieraus geht eindeutig hervor, daß das kontraktionswirksame Kalzium im wesentlichen aus anderen Quellen (z.B. intrazelluläre Speicher wie SR und Mitochondrien) stammt, deren Funktion im Rahmen der intrazellulären Kalziumaustauschvorgänge behandelt wird. Funktionen des aus dem Extrazellulärraum einströmenden Kalziums sind einerseits die Auslösung der Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Depots und zum anderen die längerfristige zeitintegrierende Kontrolle der Speicherfüllung und damit der Menge an freisetzbarem Aktivatorkalzium.

Effektive Mechanismen zum Kalziumauswärtstransport sind erforderlich, um das transmembranäre Ungleichgewicht für Kalziumionen aufrechtzuerhalten, d.h. eine Kalziumüberladung der Myokardzelle zu verhindern. Das Kalzium muß gegen einen Gradienten von 1:10000 aus der Zelle gepumpt werden. Über die zugrundeliegenden Transportmechanismen herrschen heute noch unterschiedliche Vorstellungen. REUTER und SEITZ (1968) fordern eine elektroneutrale Austauschdiffusion, wobei 1 Ca^{2+} gegen 2 Na^{+} aus der Zelle transportiert wird. Diese Austauschdiffusion ist an die Funktion der Na^{+}, K^{+}-ATPase gekoppelt und unterliegt so der Kontrolle des transmembranären Na^{+}-Gradienten.

Dagegen deuten die Untersuchungen von REEVES und SUTKO (1980) sowie MULLINS (1979) auf eine elektrogene Austauschdiffusion hin, wobei das Austauschverhältnis mit $3Na^{+}$: Ca^{2+} bzw. $4Na^{+}$: Ca^{2+} unterschiedlich angegeben wird. Eine elektrogene Aus-

tauschdiffusion ist nicht nur vom Ionengradienten, sondern auch vom Membranpotential abhängig und kann somit einen eigenen Beitrag zum Gesamtmembranstrom leisten.

Über die Austauschdiffusion hinaus existiert als weiterer Eliminationsmechanismus eine membranäre Ca^{2+}-ATPase, die in ihrer Funktion außerdem magnesiumabhängig ist. Die entsprechenden Erkenntnisse gehen im wesentlichen auf Untersuchungen von CARONI und Mitarbeitern (1980) zurück. Nach ihren Erkenntnissen arbeitet dieser Eliminationsmechanismus etwa 30 mal langsamer als die Austauschdiffusion. Die membranäre Ca^{2+}-ATPase gehört zu den zahlreichen Enzymsystemen, die durch Calmodulin aktivierbar sind. Da Calmodulin in Abhängigkeit von der vorliegenden Kalziumkonzentration aktivierend wirkt, handelt es sich hier um einen autoregulatorischen Eliminationsmechanismus (CARONI und CARAFOLI, 1980).
Neben den transsarkolemmalen Austauschvorgängen sind die intrazellulären Kalziumbewegungen von entscheidender Bedeutung für die Regulation des intrazellulären Kalziumspiegels. Potentiell an dieser Regulation beteiligte Organellen sind das Plasmalemm, das sarkoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien. Um den tatsächlichen Beitrag dieser Organellen zur elektromechanischen Koppelung beurteilen zu können, bedarf es der quantitativen Bestimmung der Kalziumeinwärts- und Auswärtsbewegungen sowie der Speicherkapazitäten der jeweiligen Organellen. Von spezieller Bedeutung sind dabei die Fragen:

1) Gibt es physiologisch bedeutsame Mechanismen, um die Freisetzung von Speicherkalzium auszulösen?
2) Arbeiten die Transportsysteme in einem für die Kontraktionsauslösung adaequaten Konzentrationsbereich?
3) Reicht die verfügbare Kalziummenge zur Aktivierung des größten Teils der kontraktilen Proteine aus?

Das sarkoplasmatische Retikulum (SR) des Herzmuskels stellt ein hochorganisiertes intrazelluläres Membransystem mit Verbindungen zum Plasmalemm und den transversalen Tubuli dar, das in enger Nachbarschaft zu den Myofibrillen der Herzmuskelzelle liegt. Seine anatomische Anordnung läßt das SR als idealen Regulator myofibrillärer Aktivität erscheinen.

Die wesentlichen Komponenten der Kalziumaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum sind:

1) eine Ca^{2+}-Mg^{2+}-abhängige ATP-ase
2) ein hochaffines Ca^{2+}-bindendes Protein (Phospholamban)
3) ein niederaffines Ca^{2+}-bindendes Protein (Calsequestrin)
4) eine definierte Lipidstruktur der Membran.

Der heutige Stand der Kenntnisse macht folgenden Transportmechanismus wahrscheinlich (MAC LENNAN und HOLLAND, 1975): Zunächst wird aus Mg-ATP^{2-}, 2 Ca^{2+} und dem ATPasemolekül ein ternärer Carrier-Komplex gebildet, aus dem ein Intermediärprodukt mit energiereicher Phosphatbindung entsteht. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um das Phosphorsäureanhydrid der γ-Carboxylgruppe einer Glutaminsäure des Enzymproteins. Der Transport des Kalziums erfolgt dann unter Bildung eines Intermediärproduktes mit energiearmer Phosphatbindung, wobei vermutlich durch konformative Umwandlung des ATPase-Moleküls die Kalziumbindungsstellen von der Membranaußen- zur -innenseite verlagert werden. Die Freigabe des Kalziums geht mit dem Zerfall des Intermediärprodukts durch ATP-Hydrolyse einher.

Es sind verschiedene effektive Regulationsmechanismen der ATP-aseaktivität bekannt. Hohe intrasarkoplasmatische Kalziumkonzentrationen können den Carrier durch kompetitive Mg^{2+}-Verdrängung und daraus resultierende Verlangsamung des Zerfalls des Intermediärprodukts hemmen (WEBER, 1971a,b). Die wichtigste Möglichkeit einer Aktivierung beruht auf dem Phospholamban-Mechanismus (WALSH et al., 1980). Phospholamban ist ein membrangebundenes hochaffin Ca^{2+}-bindendes SR-Protein; es stellt ein Dimeres aus 2 Polypeptidketten von je 11000 Dalton dar und kommt in aequimolarer Konzentration zur ATPase vor. Phospholamban ist Substrat für 2 Proteinkinasen, von denen eine c-AMP- und die andere Ca^{2+}-Calmodulin abhängig ist. Die beiden Kinasen phosphorylieren zwei verschiedene Serinreste im Phospholambanmolekül. Nach den Erkenntnissen von WALSH und Mitarbeitern führt die Phospholambanphosphorylierung durch die Ca^{2+}-Calmodulinabhängige Proteinkinase zu einer

Aktivierung der Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase, die durch Phospholambanphosphorylierung durch die c-AMP-abhängige Proteinkinase verstärkt wird. Die Aktivität der Ca^{2+}-Pumpe kann so um das Dreifache gesteigert werden (TADA et al.; 1974, 1975).

Elektrophysiologische (TRITTHART et al., 1973) sowie autoradiographische Untersuchungen (WINEGRAD 1965, 1968) haben ergeben, daß Aufnahme und Freisetzung des Aktivatorkalziums an verschiedenen Stellen des SR erfolgen. Die Ca^{2+}-Aufnahme geschieht danach im mittleren, longitudinalen Teil des SR, während die Speicherung und Freisetzung durch die lateralen Zisternen wahrgenommen wird. Die Translokation des aufgenommenen Kalziums zu den Speicher- und Freisetzungsorten führt ein Transportprotein, das Calsequestrin, durch. Calsequestrin ist ein stark negativ geladenes Protein mit einer geringen Affinität, aber hohen Bindungskapazität für Ca^{2+} (970 nmol/mg Protein). Neben seinen Transport- und Speicherfunktionen erfüllt Calsequestrin die wesentliche Aufgabe, durch seine hohe Bindungskapazität die Konzentration an ionisiertem Kalzium im SR niedrig zu halten und so eine Ca^{2+}-induzierte Hemmung der Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATPase einzuschränken.

Die Freisetzung von Kalzium aus dem SR kann nach zwei verschiedenen Mechanismen ablaufen, für die eine Vielzahl experimenteller Belege existiert:

1) die Ca^{2+} - induzierte Ca^{2+}-Freisetzung (FABIATO und FABIATO, (1978)
2) die depolarisationsbedingte Ca^{2+}-Freisetzung (COSTANTIN und PODOLSKY, 1967)

Welcher der genannten Freisetzungsmechanismen die größere physiologische Bedeutung hat, ist heute noch Gegenstand der Forschung. Von der Mehrheit der an diesem Problem arbeitenden Wissenschaftler wird die Ca^{2+}-induzierte Ca^{2+}-Freisetzung als wichtiger angesehen (siehe z.B. ADAMS und SCHWARTZ, 1980).

Auf die Bedeutung der Mitochondrien für die Kontrolle des intrazellulären Aktivatorkalziums soll hier nur kurz eingegangen

werden. Nach übereinstimmender Auffassung stellen die Mitochondrien Kalziumspeicher mit hoher Kapazität und niedriger Affinität dar, die lediglich langfristige Regulationsvorgänge kontrollieren können.

Zusammenfassend ergibt sich heute folgendes Bild der elektromechanischen Koppelung auf der Grundlage transmembranärer und intrazellulärer Kalziumbewegungen:

Der erregungsbedingte langsame Kalziumeinwärtsstrom ist nicht in der Lage, eine vollständige kontraktile Aktivierung auszulösen. Der größte Teil des kontraktionswirksamen Kalziums muß daher aus intrazellulären Speichern freigesetzt werden. Bis auf wenige Ausnahmen (LANGER, 1973; LÜLLMANN und PETERS, 1977) herrscht heute weitgehende Übereinstimmung, daß dem sarkoplasmatischen Retikulum die entscheidende Bedeutung bei der Speicherung koppelungswirksamen Kalziums zukommt. Die Menge an freisetzbarem Kalzium hängt unmittelbar vom Füllungszustand des SR ab, der vom transmembranären Kalziumeinstrom kontrolliert wird. Auslöser der Kalziumfreisetzung aus dem SR ist die über die transversalen Tubuli ins Zellinnere fortgeleitete Membranerregung. Als Freisetzungsmechanismen werden eine Ca^{2+}-induzierte und eine depolarisationsinduzierte Form diskutiert. Freisetzungsorte des Aktivatorkalziums sind die lateralen Zisternen. Nach erfolgter Kontraktion wird das Kalzium zur Muskelerschlaffung im mittleren longitudinalen Teil des SR aktiv durch eine Ca^{2+}-Pumpe wieder aufgenommen, an Calsequestrin gebunden und zur erneuten Freisetzung in die lateralen Zisternen transportiert.

Der Kalziumefflux aus der Zelle wird über eine Na^{+}-Ca^{2+}-Austauschdiffusion sowie eine membranäre Mg^{2+}-Ca^{2+}-ATPase reguliert.

Schematisch sind die geschilderten Zusammenhänge in Abb. 4 zusammengefaßt.

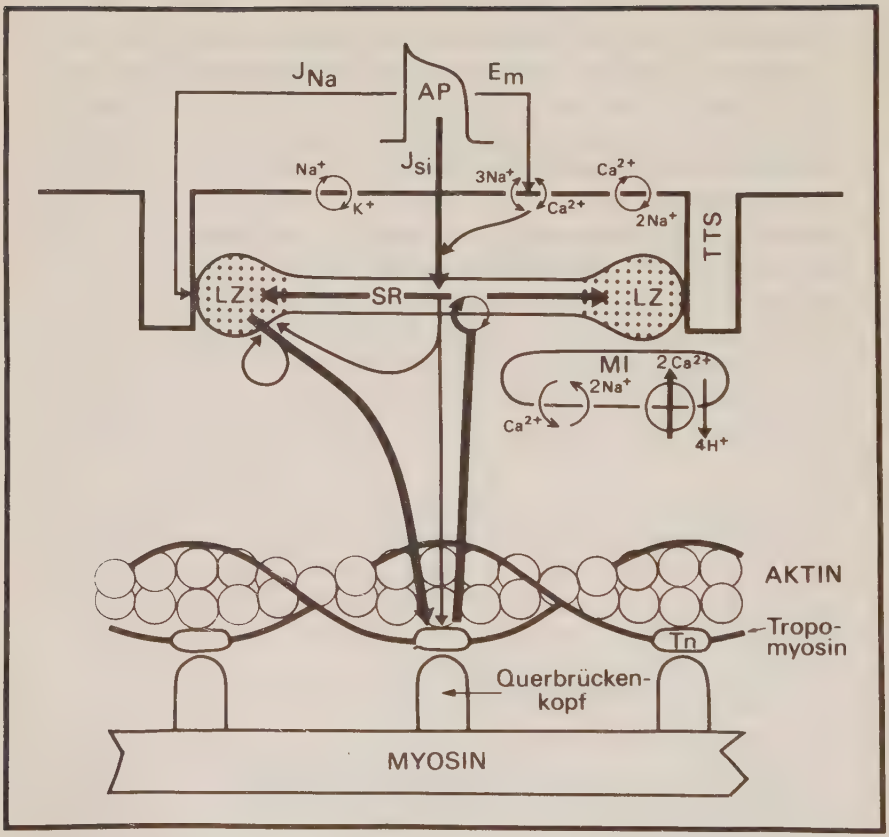


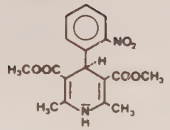
Abb. 4 : Schema der Ca^{2+}-Bewegungen im Rahmen der elektro-mechanischen Kopplung nach BAYER (1982).

ZUR CHEMIE UND PHARMAKOLOGIE DER UNTERSUCHUNGSSUBSTANZEN

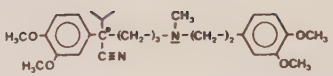
Die Mehrheit der in dieser Arbeit untersuchten Substanzen gehört pharmakologisch in die Klasse der sogenannten Kalziumantagonisten. Seit FLECKENSTEIN und Mitarbeiter (FLECKENSTEIN et al., 1967, 1969) das kalziumantagonistische Wirkprinzip als Grundlage der koronargefäßerweiternden Eigenschaften von Verapamil und Prenylamin erkannten, wurden in den folgenden Jahren zahllose Substanzen unterschiedlichster chemischer Struktur (siehe Tabelle 2) in diese neue Stoffklasse eingereiht. Hierzu gehören unter anderem die Pharmaka Fendilin (FLECKENSTEIN et al., 1977), Diazoxid (BRISTOW und GREEN, 1977), Perhexilin (FLECKENSTEIN-GRÜN et al., 1978), Cinnarizin (VAN NUEHN und VAN HOUTTE, 1980), Nifedipin (VATER et al., 1972), Bencyclan (KAUFMANN, 1977), Tiapamil (THORENS und HAEUSLER, 1979), Diltiazem (SATO et al., 1971), Molsidomin (KOKUCHI et al., 1970), Bepridil (VOGEL et al., 1979) und AQA 39 (TRAUTWEIN, 1981).

Vergleicht man die chemischen Strukturen der angeführten Pharmaka, so fallen vor allem zwei immer wiederkehrende Strukturelemente auf: zum einen aromatische Ringsysteme, deren hervorragende Eignung als haptophore Gruppen seit langem bekannt ist (VARGA und NADOR, 1968; SEITZ, 1976; KOROLKOVAS, 1974); zum anderen sind alle genannten Pharmaka stickstoffhaltige Verbindungen. Hierbei kann man je nach Einbau des Stickstoff im Molekül zwei große Gruppierungen unterscheiden: N-Heterocyclen, in denen der Stickstoff Bestandteil der Ringsysteme ist und alphatische Amine, in denen das Stickstoffatom in Ketten eingebaut ist. Diese Unterteilung ist nicht nur formaler Natur, sondern beschreibt ganz ausgeprägte stereochemische Eigenschaften der beiden Gruppen. Die N-Heterocyclen stellen relativ starre, unbewegliche Moleküle dar, während die aliphatischen Amine konformativ extrem beweglich sind. Die Kalziumantagonisten gliedern sich wie folgt in diese zwei chemischen Klassen:

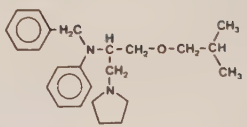
NIFEDIPIN



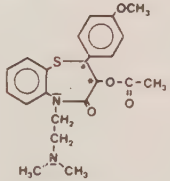
VERAPAMIL



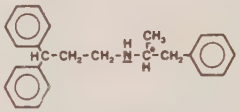
BEPRIDIL



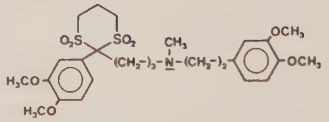
DILTIAZEM



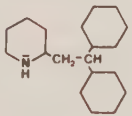
PRENYLAMIN



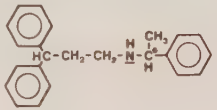
TIAPAMIL



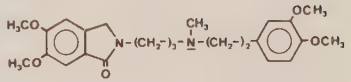
PERHEXILIN



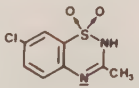
FENDILIN



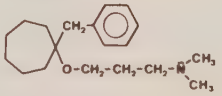
AQ-A 39



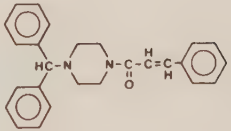
DIAZOXID



BENCYCLAN



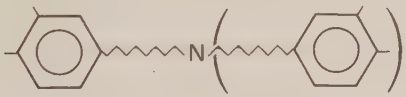
CINNARIZIN



Tab. 2: Strukturformeln von Pharmaka, die in der Literatur als Kalziumantagonisten klassifiziert worden sind.

N-Heterocyclen	aliphatische Amine	
Nifedipin	Verapamil	Tiapamil
Diltiazem	Prenylamin	Bepridil
Perhexilin	Fendilin	
Diazoxid	Bencyclan	

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit befasst sich ausschließlich mit Pharmaka aus der Gruppe der aliphatischen Amine (Strukturformeln siehe 7.1), deren allgemeines Bauprinzip dem folgenden Schema entspricht:



Ein oder zwei aromatische Ringstrukturen sind über aliphatische Ketten unterschiedlicher Länge an ein Stickstoffatom angebunden. Anhand dieses Bauprinzips sind neben den bereits erwähnten Kalziumantagonisten die strukturverwandten Pharmaka Mebeverin, Dilazep, Hexobendin und Aprindin in die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit einbezogen worden. Über die bereits genannten chemischen Gemeinsamkeiten hinaus ist das häufige Auftreten von Methoxysubstituenten (5 von 10 Untersuchungssubstanzen) an den aromatischen Ringen zu erwähnen. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, daß bei der Entwicklung der hier interessierenden Substanzen zwei Naturstoffe (Khellin und Papaverin) mit entsprechender Ringsubstitution als Leitsubstanzen gedient haben. Trotz der aufgezählten übereinstimmenden Strukturelemente bleibt festzuhalten, daß die strukturellen Unterschiede zwischen den einzelnen Pharmaka groß genug sind, um einen einheitlichen molekularen Wirkungsmechanismus auszuschließen. Die daraus resultierenden pharmakologischen Unterschiede sollen im folgenden kurz für die einzelnen Untersuchungssubstanzen zusammengefaßt werden.
Zunächst sei auf die Gruppe der kalziumantagonistischen aliphatischen Amine eingegangen. Nach der ursprünglichen Definition

von Fleckenstein sind Kalziumantagonisten Pharmaka, die den erregungsbedingten Ca^{2+}-Einwärtsstrom an Herz- und glatten Gefäßmuskeln zu hemmen vermögen. Mit Hilfe der Spannungsklemmen-Methode läßt sich für jedes Pharmakon nachprüfen, ob eine direkte Hemmung des transmembranären Kalzium-Einwärtsstromes vorliegt bzw. auf welche Weise diese Hemmung zustandekommt. Dabei kommen folgende Möglichkeiten grundsätzlich in Betracht:

1) Der transmembranäre Ca^{2+}-Ionengradient (d.h. die treibende Kraft für den Ca-Einwärtsstrom) kann reduziert werden, etwa dadurch, daß in der Glykokalix die Beweglichkeit oder Zahl der verfügbaren Ca^{2+}-Ionen vermindert wird,
2) die Zahl der verfügbaren "Ca-Kanäle" kann vermindert werden, ohne daß sich die Leitfähigkeit des einzelnen Kanals ändert, und
3) das Pharmakon kann in die verschiedenen Steuerungsprozesse des spezifischen Membrankanals eingreifen. Hemmstoffe der Ionenleitfähigkeiten in erregbaren Membranen können unter Umständen recht spezifisch den einen oder anderen dieser Grundmechanismen beeinflussen, wie man aus Untersuchungen über den schnellen "Na-Kanal" längst weiß. Doch auch für den langsamen "Ca-Kanal" mehren sich die Hinweise, daß Ca-antagonistische Pharmaka in ganz unterschiedlicher Weise in diese Kinetiken eingreifen können.

Aufgrund der ersten Spannungsklemmen-Experimente von KOHLHARDT und Mitarbeitern (1972) waren Verapamil und sein Methoxyderivat D 600 als selektive Hemmstoffe des Ca^{2+}-Einstroms bezeichnet worden, die kompetitiv mit Kalziumionen um gemeinsame Bindungsstellen konkurrieren und keine Effekte auf den schnellen Na^{+}-Einwärtsstrom ausüben. Generell ist die Hemmwirkung von Verapamil auf den langsamen Einwärtsstrom von vielen Autoren, sowohl für den Herzmuskel (NAWRATH et al., 1977; EHARA und KAUFMANN, 1978; McDONALD und TRAUTWEIN, 1978) als auch für Purkinje-Fasern (KASS und TSIEN, 1975) bestätigt worden. Aber sowohl die Kompetitions-Hypothese als auch die Annahme einer selektiven Kalziumkanalwirkung hielten weiterer Überprüfung nicht stand. Verschiedene Autoren (Mc CANS et al., 1974; BAYER et

al., 1975a; LUDWIG und NAWRATH, 1977) konnten zeigen, daß die negativ inotrope Wirkung von Verapamil frequenzabhängig ist und durch Gabe von Extra-Kalzium nicht vollständig wieder aufgehoben werden konnte (BAYER et al., 1975a,b; NAWRATH, 1979). Auch andere positiv inotrope Agentien wie Isoprenalin (NAWRATH, 1979) und Herzglykoside (SCHÜMANN et al., 1977) können die negativ inotropen Effekte von Verapamil nur teilweise antagonisieren. GÖRLITZ et al.(1975) haben aufgrund dieser Erkenntnisse den Terminus des funktionellen Kalziumantagonismus eingeführt. Spannungsklemmenexperimente an Katzenpapillarmuskeln (EHARA und KAUFMANN, 1978) sowie an Katzentrabekeln (KOHLHARDT et al., 1972) und Purkinje-Fasern des Rinds (KASS und TSIEN, 1975) erlauben die folgenden Aussagen über die Hemmwirkung von Verapamil und D 600 auf den langsamen Einwärtsstrom: die Untersuchungssubstanzen beeinflussen dessen kinetische Kontrollparameter, indem sie sowohl die Aktivierung als auch die Erholung von der Inaktivierung frequenzabhängig verlangsamen. Die Wirkstärke ist nicht nur von der benutzten Reizfrequenz, sondern darüberhinaus von der Einwirkdauer des applizierten Arzneistoffs abhängig. Alle aufgezählten Effekte sind stereoselektiv und im wesentlichen dem S(-)-Enantiomer zuzuordnen. Die erwähnte Verlangsamung des "recovery"-Prozesses ist von besonderer Bedeutung, da hierin die Wirksamkeit von Verapamil bei der Behandlung von Tachyarrhythmien des re-entry Typs begründet sein könnte.

Neben Verapamil ist Prenylamin als einziger Kalziumantagonist einer Spannungsklemmanalyse unterzogen worden. HAAS et al. (1975) konnten eine Hemmwirkung dieser Substanz auf den langsamen Einwärtsstrom an Vorhoffasern des Frosches demonstrieren. Strenggenommen sind demnach nur Verapamil und Prenylamin sowie das hier nicht untersuchte Nifedipin (KOHLHARDT und FLECKENSTEIN, 1977) als Kalziumantagonisten nachgewiesen worden. Während Fleckenstein in seiner ursprünglichen Definition von einem einheitlichen Hemmmechanismus ausging, zeigt ein Wirkvergleich von Nifedipin und Verapamil die unterschiedlichen qualitativen Möglichkeiten einer Hemmung des langsamen Einwärtsstromes. Verapamil verändert in oben beschriebener Weise die kinetischen Kontrollparameter, während Nifedipin diese völlig unbeeinflußt läßt und lediglich die Zahl verfügbarer Kalziumkanäle mindert.

Kalziumantagonisten sind darüberhinaus keine selektiven Hemmstoffe des langsamen Einwärtsstroms, sondern üben dosisabhängig auch Hemmwirkungen auf andere Membranströme aus. HAAS et al. (1975) konnten eine ausgeprägte Hemmwirkung auf den schnellen Einwärtsstrom durch Prenylamin nachweisen. BAYER et al. (1975c) wiesen eine solche natriumantagonistische Wirkung für Verapamil und D 600 nach. Dieser frequenzabhängige Verapamileffekt ist ebenfalls stereoselektiv und im wesentlichen dem R-(+)-Enantiomer zuzuordnen. Eine Inhibition des schnellen Natriumstroms wird auch Fendilin (FLECKENSTEIN et al., 1977) und Tiapamil (BAYER und EPP, 1979) zugeschrieben. Unter Verapamil (EHARA und KAUFMANN, 1978) ist eine Verminderung des K^+-Auswärtsstroms beobachtet worden. Dieser Effekt muß jedoch nicht unbedingt Folge einer direkten K^+-Kanal-Wirkung sein. Untersuchungen von ISENBERG (1977) haben gezeigt, daß eine verminderte intrazelluläre Kalziumkonzentration den K^+-Auswärtsstrom verlangsamt. Die Verapamilwirkung auf den K^+-Auswärtsstrom läßt sich damit auch als indirekte Folge seiner kalziumantagonistischen Eigenschaften erklären. Die gleichen Zusammenhänge gelten auch für Prenylamin (HAAS et al., 1975) sowie Bepridil (VOGEL et al., 1979).

Die erwähnten Wirkungen von Kalziumantagonisten auf transmembranäre Ionenströme stellen die elementare Basis der wichtigsten pharmakodynamischen Eigenschaften dieser Verbindungen dar. Die therapeutische Eignung als Antiarrhythmika, Antihypertensiva und antianginös wirksame Pharmaka wird auf der Grundlage einer Hemmung von transmembranären Ionenbewegungen verständlich. Von elektrophysiologischer Bedeutung sind dabei die Pharmakoneffekte auf Arbeitsmyokard und Schrittmachergewebe des Herzens.

Am Ventrikelmuskel bewirkt z.B. razemisches Verapamil im einzelnen (BAYER et al., 1975c):

1) Eine frequenzabhängige Hemmung des potentialabhängigen transmembranären Ca^{2+}-Einwärtsstroms (= kalziumantagonistische Komponente),
2) eine frequenzabhängige Hemmung des potentialabhängigen schnellen Na^{2+}-Einwärtsstroms (= natriumantagonistische bzw. lokal-

anaesthetische Komponente), und

3) eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer (Verlängerung der absoluten und relativen Refraktärzeit).

Während die unter 1) genannte Teilwirkung razemischen Verapamils hauptsächlich durch das S-(-)-Enantiomer getragen wird, zeigt das R-(+)-Enantiomer nur geringe kalziumantagonistische Effekte. Dagegen sind die unter 2) und 3) genannten Teilwirkungen vorwiegend an das R-(+)-Enantiomer gebunden.

Die lokalanaesthetische Wirkung von Verapamil ist zuerst von PODRIGUEZ-PEREIRA und VIANA (1968) sowie von BAKER et al. (1973) am Nerven gezeigt und später von ROSEN et al. (1974), NABATA (1977) sowie KECSKEMETI et al. (1978) am Herzen bestätigt worden. Die bisher umfassendste Analyse der elektrophysiologischen Eigenschaften von Verapamil und seinen Enantiomeren wurde von BAYER et al. (1975c) durchgeführt. Über die oben bereits erwähnten Ergebnisse am Ventrikelmyokard hinaus konnten diese Autoren an isolierten Sinusknotenpraeparationen eine Reduktion der Entladungsfrequenz unter Einwirkung der Verapamilenantiomere demonstrieren. Die zugrundeliegenden Mechanismen unterscheiden sich allerdings deutlich. (-)-Verapamil führt zu einer Abnahme von overshoot und Aufstrichtsgeschwindigkeit des Sinusknoten-Aktionspotentials; darüberhinaus wird die langsame diastolische Depolarisation reduziert. (+)-Verapamil läßt die genannten Parameter unbeeinflußt und führt wahrscheinlich über eine Verschiebung des Schwellenpotentials für die Aktivierung des depolarisierenden Einwärtsstroms in Richtung weniger negativer Potentialwerte zu einer ausgeprägten Abnahme der Entladungsfrequenz.

Für die Verbindung Prenylamin ist eine kalziumantagonistische Wirksamkeit zunächst von FLECKENSTEIN et al. (1967) postuliert und von HAAS et al. (1975) am Froschvorhof durch Spannungsklemmenanalyse bewiesen worden. Von elektrophysiologischer Bedeutung ist darüberhinaus eine ausgeprägte Hemmung der Aufstrichsgeschwindigkeit, wie sie von HAAS et al. (1975) am Froschvorhof, von HASHIMOTO et al. (1978) am Meerschweinchenvorhof und von BAYER et al. (1976) am Katzenpapillarmuskel gezeigt worden ist. Prenylamin hemmt auch den repolarisierenden K^+-Ausstrom (HAAS et al., 1975).

Dies führt zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer (HASHIMOTO et al., 1978).

Für Fendilin ist bisher nur eine Publikation über elektrophysiologische Arbeiten veröffentlich worden (FLECKENSTEIN et al., 1977). Die beobachtete Verkürzung der Plateauphase im Aktionspotential wird dabei als Folge einer Hemmung des langsamen Einwärtsstroms interpretiert. Bei sehr hohen Konzentrationen wurde darüberhinaus eine Verringerung von overshoot und maximaler Aufstrichsgeschwindigkeit beobachtet. Diese natriumantagonistische Wirkung ist nach bisher unveröffentlichten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (BAYER et al., 1982) ausgeprägt frequenzabhängig. Die Aktionspotentialdauer wird möglicherweise aufgrund einer K^+-Leitfähigkeitssteigerung durch Fendilin geringfähig verkürzt.

Die Klassifizierung von Bepridil als kalziumantagonistische Verbindung geht auf Untersuchungen der Arbeitsgruppe um SPERELAKIS zurück. VOGEL et al. (1979) konnten eine ausgeprägt frequenzabhängige Hemmung von sogenannten langsamen Aktionspotentialen an isoliert perfundierten Herzen des Meerschweinchens demonstrieren. Darüberhinaus verlangsamt Bepridil die AV-Überleitungszeit.
Die bisher vorgestellten Befunde aus Spannungsklemmexperimenten und elektrophysiologischen Untersuchungen charakterisieren die allgemein als Kalziumantagonisten bezeichneten Untersuchungssubstanzen als Wirkstoffe mit bevorzugter - qualitativ und quantitativ jedoch sehr unterschiedlicher - Wirkung auf den langsamen Einwärtsstrom von Arbeitsmyokard und Erregungsleitungsgewebe. Daneben üben diese Substanzen aber auch mehr oder weniger ausgeprägte Effekte auf Natrium- und Kaliumströme des erregten Gewebes aus. Spannungsklemmenanalyse und Elektrophysiologie ermöglichen eine differenzierte molekularpharmakologische Klassifizierung kalziumantagonistischer Pharmaka und bilden so die Grundlage für ihre klinisch-therapeutische Anwendung. Ebenso vielfältig wie die elektrophysiologischen Eigenschaften sind die inotropen Effekte, die durch Kalziumantagonisten am Myokard hervorgerufen werden können. Eine Vielzahl

von Autoren konnte an isolierten Herzpräparaten die negativ inotrope Wirkung von Verapamil belegen (Fleckenstein et al., 1967; SILVA GRACA und VAN ZWIETEN, 1971; NAYLER und SZETO, 1972; Mc CANS et al., 1974; GÖRLITZ et al., 1975; BAYER et al., 1975a; LUDWIG und NAWRATH, 1977; BLEEKER und VAN ZWIETEN, 1978). Auch für die Kalziumantagonisten Prenylamin (FLECKENSTEIN et al., 1967), Fendilin (FLECKENSTEIN et al., 1977), Bencyclan (KAUFMANN, 1977), Bepridil (VOGEL et al., 1979) und Tiapamil (RODENKIRCHEN, 1979) sind negativ inotrope Eigenschaften belegt.

Auch bezüglich ihrer negativ inotropen Eigenschaften weisen die Kalziumantagonisten ausgeprägte qualitative und quantitative Unterschiede auf. Mc CANS et al., (1974) sowie KAUFMANN et al. (1974) konnten z.B. zeigen, daß die Wirkstärke von Verapamil deutlich von der jeweils benutzten Reizfrequenz abhängt. Ein Vergleich der Frequenzabhängigkeit der negativ inotropen Wirkung von Kalziumantagonisten läßt erkennen, daß neben frequenzunabhängig wirkenden Substanzen (Nifedipin und Prenylamin) Pharmaka mit bevorzugter Wirksamkeit bei niedriger Reizfrequenz (z.B. Bencyclan und Bepridil) von solchen mit bevorzugter Wirksamkeit bei hoher Reizfrequenz (z.B. Fendilin und Verapamil) unterschieden werden können.

Über die bisher beschriebenen kardialen Effekte hinaus üben Kalziumantagonisten klinisch bedeutsame Effekte an der glatten Muskulatur aus (Übersichtsarbeit siehe MEISEL et al., 1976). Z.B. unterdrücken Verapamil und Nifedipin die "spike"-Entladungen in Praeparationen von Uterus (FLECKENSTEIN et al., 1971), taenia coli (DIEMER et al., 1974) und Portalvene (GOLENHOFEN und HERMSTEIN, 1975). Gefäßmuskelstreifen von Koronar-, Pulmonal- und Hirnarterien werden unter dem Einfluß von Kalziumantagonisten erschlafft (PEIPER und SCHMIDT, 1972). MASSINGHAM (1975) und NGUYEN-DONG und BRECHT (1977) konnten an isolierten Gefäßstreifen zeigen, daß Kalziumantagonisten KCl-induzierte Kontraktionen wesentlich wirksamer erschlaffen als Noradrenalin-induzierte Kontrakturen. Daraus schließt man, daß die Grundwirkung der Kalziumantagonisten am glatten Gefäßmuskel im wesentlichen in einer Hemmung des Ca^{2+}-Einstroms besteht, während die intrazelluläre, z.B. durch Noradrenalin bedingte Kalziumfrei-

setzung wenig beeinflußt wird. In Übereinstimmung mit dieser These wirken Kalziumantagonisten auch nicht an Fluorid-induzierten Kontrakturen, die ebenfalls unabhängig von extrazellulärem Kalzium sind (FERMUM et al., 1977). Zusätzlich zu den bisher erwähnten Eigenschaften besitzen einige Kalziumantagonisten intrazelluläre Wirkungen, wie z.B. eine Hemmung der Phosphodiesterase (PÖCH und KUKOVETZ, 1972; PÖCH und UMFAHRER, 1976; HÄUSLER et al., 1972). Therapeutisch finden Kalziumantagonisten im wesentlichen bei der koronaren Herzkrankheit, bei Herzrhythmusstörungen sowie der Hypertonie Anwendung. Grundlage der antianginösen Wirksamkeit ist - neben einer direkten koronardilatatorischen Komponente (vasospastische Angina) - eine Verminderung von pre- und afterload des Herzens auf Grund einer peripheren Widerstandssenkung. Auch die antihypertensive Wirksamkeit ist Folge der vasodilatatorischen Eigenschaften von Kalziumantagonisten an den Widerstandsgefäßen. Die antiarrhytmische Wirksamkeit läßt sich zum einen auf eine Hemmung pathologischer, Ca-getragener langsamer Aktionspotentiale sowie auf Natrium-antagonistische "Nebeneffekte" verschiedener Kalziumantagonisten zurückführen.
Diesem relativ breiten Spektrum klinisch erwünschter Pharmakoneffekte stehen eine Reihe z.T. potentiell bedrohlicher Nebenwirkungen gegenüber. Hier sind unter anderem Verminderungen der Kontraktionskraft des Herzens, AV-Überleitungsstörungen sowie teilweise bedrohliche Blutdrucksenkungen zu nennen.
In einer Reihe von Übersichtsarbeiten sind die pharmakologischen und klinischen Eigenschaften kalziumantagonistischer Pharmaka zusammendfassend beschrieben (FLECKENSTEIN, 1977; KAUFMANN und BAYER, 1980; HENRY, 1980; TRIGGLE und SWAMY, 1980; BAYER et al., 1982; MANNHOLD et al., 1982).

Als strukturell mit den Kalziumantagonisten verwandte Vergleichssubstanzen wurden die beiden Koronardilatatoren Dilazep und Hexobendin sowie das Antiarrhythmikum Aprindin und das muskulotrope Spasmolytikum Mebeverin in die vorliegenden Untersuchungen einbezogen.

4. DIE ZIELVORSTELLUNGEN ZU DEN VORLIEGENDEN UNTERSUCHUNGEN

Die Untersuchungssubstanzen der vorliegenden Arbeit sind sechs Kalziumantagonisten vom aliphatischen Amintyp, sowie vier strukturverwandte herz- und gefäßaktive Pharmaka. Umfangreiche biologische und physikalisch-chemische Untersuchungen sollen dazu dienen, die genannten Verbindungen molekularpharmakologisch zu charakterisieren und zu differenzieren.
Die inotropen Eigenschaften der Arzneistoffe werden am isoton kontrahierenden Katzenpapillarmuskel untersucht. Dabei wird eine qualitative (Wirkmuster) und quantitative Charakterisierung (Konzentrations-Wirkungskurven) der Pharmaka durchgeführt.

Neben diesen Experimenten zur Wirkqualität der Verbindungen wird anhand des LAMMA-Verfahrens eine Analyse der zellulären Lokalisation und damit ein Beitrag zur Wirkortbestimmung der Testsubstanzen angestrebt.

Der physikalisch-chemischen Charakterisierung dienen die Bestimmung von R_M-Werten zur Analyse lipophiler Substanzeigenschaften, sowie die pK-Wertermittlung (Wirkformbestimmung), die Messung der Substituentenpolarisierbarkeit und die Bestimmung des molekularen Dipolmoments zur Analyse elektronischer Wirkstoffeigenschaften.
Basierend auf der biologischen und physikalisch-chemischen Charakterisierung von Untersuchungssubstanzen soll in einem zweiten Schritt eine umfassende Struktur-Wirkungsanalyse durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit werden für den klinisch bedeutsamsten Kalziumantagonisten Verapamil derartige Struktur-Wirkungsbeziehungen ermittelt. Dabei gilt es zunächst, die wirkbestimmenden oder pharmakophoren von den affinitätsbestimmenden oder haptophoren Molekülstrukturen zu differenzieren (→ qualitative Struktur-Wirkungsanalyse).

Mit Hilfe angewandter statistischer Verfahren soll dann die gemessene biologische Wirkung zu bestimmten physikalisch-chemischen Eigenschaften in eine quantitative Beziehung gesetzt werden. Dabei dient die HANSCH-Analyse der Ermittlung der entscheidenden Substituenten- bzw. Moleküleigenschaften, während das Monopol-Bindungspolarisierbarkeitsverfahren die Bestimmung potentieller Rezeptorstrukturen für die Arzneistoffwechselwirkung erlaubt.

Die vorliegende Arbeit basiert auf bereits veröffentlichten Ergebnissen (BAYER et al., 1975a,b; MANNHOLD et al., 1978; MANNHOLD et al., 1980; MANNHOLD et al., 1981; RODENKIRCHEN et al., 1980; HÖLTJE et al., 1981) und enthält darüberhinaus neue, noch nicht publizierte Befunde.

2. METHODEN

2.1. DIE ERFASSUNG KONTRAKTILER EIGENSCHAFTEN AM PAPILLARMUSKEL

2.1.1. Die Präparation der Papillarmuskeln

Katzen beiderlei Geschlechts mit einem Körpergewicht zwischen 1 und 2 kg wurden unter leichter Äthernarkose getötet, die Herzen schnell entnommen und in ein Präparationsbad mit Carbogen-gesättigter Tyrodelösung von 30°C überführt. Der rechte Ventrikel wurde entlang der Ventrikel-Septumsgrenze eröffnet. Die Papillarmuskeln wurden herauspräpariert, wobei ein Teil der Tricuspidalklappe und ein kleiner Teil der Ventrikelwand belassen wurden. Diese Präparationsweise war erforderlich, um die Muskeln geeignet im Versuchsbad fixieren zu können und um Verletzungen der Präparate (→ Automatiebildung) zu verhindern. Es wurden nur solche Präparate verwendet, die einen Durchmesser zwischen 0.5 und 1.0 mm und eine Länge von 6.5 bis 8.5 mm besaßen sowie eine gleichmässige zylindrische Form ohne seitliche Verzweigungen aufwiesen. Nach der Präparation wurden die Papillarmuskeln sofort in das Versuchsbad überführt.

2.1.2. Das Versuchsbad und die muskelmechanischen Arbeitsbedingungen

Zur Erfassung der kontraktilen Eigenschaften isolierter Papillarmuskeln diente der in Abb. 5 gezeigte Versuchsaufbau. Das Muskelbad bestand aus einem quaderförmigen Plexiglasblock, in den eine oben offene Flüssigkeitskammer eingefräst war. Die Perfusion mit Tyrodelösung erfolgte aus einem Vorratsgefäß (500 ml Inhalt) rezirkulierend mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 70 ml/min. Während des Perfusionskreislaufs durchlief die Tyrodelösung zwei Wärmeaustauscher. Im ersten Austauscher - unmittelbar vor Eintritt in das Versuchsbad - wurde die Lösung auf 32° C (Versuchstemperatur) erwärmt, im zweiten wurde sie - nach Verlassen des Versuchsbades - wieder auf 20° C abgekühlt. Dadurch wurde eine aus-

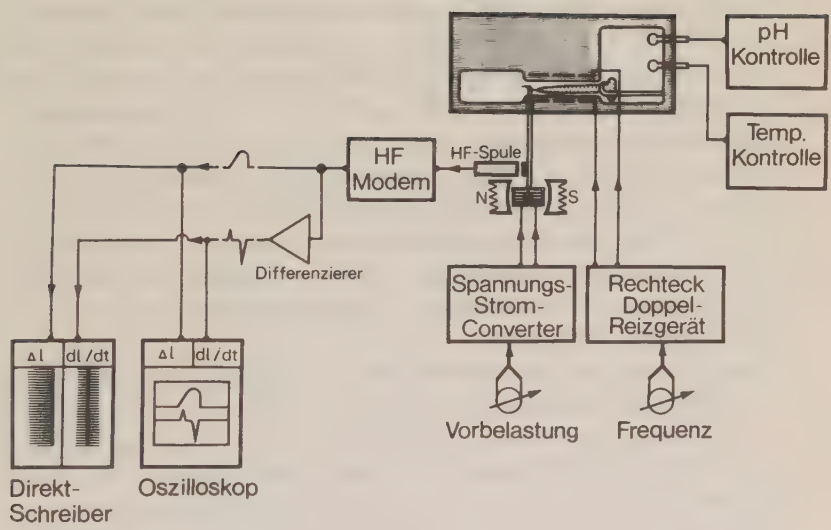


Abb. 5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Erfassung kontraktiler Phänomene: HF(Hochfrequenz)-Modem und HF-Spule = Wegmeßeinrichtung; Δl = Verkürzungsamplitude; dl/dt = Verkürzungsgeschwindigkeit (nähere Erläuterungen siehe Text).

Präparat	: Katzenpapillarmuskel
Temperatur	: 32°C (± 0.1°C)
Reizfrequenzen	: 6, 12, 30, 60 Reize/min
Vorbelastung	: 0.007 Nmm^{-2}
Reizbedingungen:	Feldreizung (Ag/AgCl-Elektroden) 0.3 ms Dauer bei 5-facher Schwellenintensität
pH	: 7.4 (± 0.01)

reichende Gassättigung im Carbogen-durchperlten Vorratsgefäß gewährleistet. Die Temperatur im Versuchsbad wurde während des gesamten Experimentes mittels einer Thermosonde registriert und konnte durch Variation der Perfusionsgeschwindigkeit auf $\pm$ 0.1° C konstant gehalten werden. Zur Einstellung von Gleichgewichtsbedingungen wurden die Papillarmuskeln zunächst eine Stunde lang bei einer Frequenz von 30/min elektrisch gereizt. Es wurden nur solche Präparate für die Experimente benutzt, die keine Neigung zu Extrasystolen zeigten und die sich am Ende der Äquilibrierungszeit um mindestens 20% ihrer Ausgangslänge verkürzten. Als Ausgangslänge L_i wurde diejenige Muskellänge definiert, die das Präparat bei einer Vorbelastung von 0.007 Nmm^{-2} am Ende der Äquilibrierungsperiode einnahm. Diese Länge entspricht in erster Näherung L_o, d.h. derjenigen Muskellänge, bei der die aktive Längen-Spannungsbeziehung des Muskels ihr Maximum erreicht.

Die isoton kontrahierenden Papillarmuskeln wurden durch ein Rechteck-Doppelreizgerät (Hugo Sachs Elektronik) über zwei präparatparallele Ag/AgCl-Elektroden "overall" gereizt. Es wurden Reize von 0.3 ms Dauer bei 5-facher Schwellenintensität gewählt. Bei Vorversuchen stellte sich heraus, dass die Kontraktionsamplitude bei längeren Reizdauern von der Reizintensität abhängig war. Die signifikante Reizschwellenerhöhung höherer Dosen der Untersuchungssubstanzen konnte durch Reize 5-facher Schwellenintensität kompensiert werden.

2.1.3. Der Muskelhebel und die Wegmeßeinrichtung

Als Muskelhebel diente ein umgebautes Drehspulinstrument. Dabei wurde die Rückholfeder entfernt und anstelle des Zeigers ein 25 mm langer Aluminiumhebel angebracht. Die Spitze des Aluminiumhebels bestand aus einem pinzettenähnlichen, abgeflachten Schaft, der im rechten Winkel zur Bewegungsrichtung des Hebels gebogen war und senkrecht in

das Versuchsbad eintauchte. An der Hebelspitze wurden die Muskeln mit ihrem sehnigen Ende befestigt. Der Ventrikelwandrest am anderen Ende des Präparates wurde fest in einer Öse arretiert. Bei Gleichstromfluß durch die Spule des Drehspulinstruments konnten an der Spitze des Hebels Ablenkkräfte bis zu 2 g erzeugt werden. Der Stromfluß durch die Spule wurde durch eine elektronische Steuereinheit geregelt.
Zur Registrierung der Muskelverkürzung wurde eine Wegmeßeinrichtung benutzt, die in das System des Muskelhebels fest integriert war. Diese bestand aus einer kleinen Spule mit einem ferromagnetischen Kern. Die Spule (Induktivität ca. 670 µH) war Teil eines Schwingkreises (250 Hz). Geringe Änderungen der Spuleninduktivität wurden durch ein kleines Aluminiumplättchen hervorgerufen, das an dem elektromagnetischen Hebelsystem angebracht war. Die durch die Auslenkung des Hebels verursachten Änderungen der Oszillatorfrequenz wurden in eine analoge Gleichspannung umgewandelt. Diese wurde über einen Funktionsgenerator elektronisch linearisiert. So wurde eine Linearität des Systems über 4 mm Wegauslenkung an der Spitze des Muskelhebels erzielt (Fehlerbreite der Linearität $\pm$ 1%). Außerdem wurde das Verkürzungssignal elektronisch differenziert, um Verkürzungs- und Erschlaffungsgeschwindigkeit zu ermitteln. Diese Signale wurden auf einem Oszilloskop (Tektronix Type R 564B) überwacht und auf einem Direktschreiber (Watanabe WTR 281) registriert.

4. Die Lösungen

Die bei den Experimenten benutzte, modifizierte Tyrodelösung hatte folgende Zusammensetzung (mM): NaCl 136.9; KCl 2.68; $NaHCO_3$ 11.9; $CaCl_2$ 2.5; NaH_2PO_4 0.42; Glucose 10.0. Der Gasfluß in der Carbogen-durchperlten Tyrodelösung wurde mittels eines elektrischen pH-Meters so überwacht, daß ein pH von 7.4 $\pm$ 0.01 konstant gehalten wurde.

2.1.5. Die experimentellen Ansätze

Als biologisches Testmodell zur Analyse der inotropen Wirkung der Untersuchungssubstanzen diente der isoton kontrahierende Katzenpapillarmuskel. An diesem Präparat wurden Amplituden-Frequenz- und Amplituden-Pausenbeziehungen ermittelt. Amplituden-Frequenzbeziehungen wurden für die Reizfrequenzen 6, 12, 30 und 60/min aufgenommen. Zum quantitativen Wirkvergleich wurden Konzentrations-Wirkungskurven für die Reizfrequenz 60/min ermittelt. Die Konzentrations-Wirkungskurven wurden kumulativ bestimmt, da in Vorversuchen die Substanzeffekte selbst nach 2 Stunden nicht vollständig ausgewaschen werden konnten. Die Einwirkzeit der Substanzen betrug für jede Konzentration 45 Minuten. Für die Versuchsauswertung wurden die Kontraktionsamplituden unter Kontrollbedingungen als 100%-Wert angenommen und die Amplituden unter Substanzeinwirkung in prozentuale Beziehung zu den Kontrollwerten gesetzt.

Die Amplituden-Pausenbeziehungen wurden nach folgendem Schema ermittelt: Nach einer frequenten Dauerreizung (60/min) wurde die Reizung unterbrochen und nach Pausen unterschiedlicher Länge (500 ms → 10 s) eine Testkontraktion ausgelöst. Die Amplituden der Testkontraktionen wurden auf die Höhe der Gleichgewichtsamplitude während der frequenten Dauerreizung (= 100%) bezogen. Die graphische Auswertung setzt die Amplitude der Testkontraktion zur Pausendauer in Beziehung und erlaubt die Ermittlung von Zeitkonstanten für die Restitutionskinetik.

DIE UNTERSUCHUNG DER ZELLULÄREN VERTEILUNG MIT HILFE DER LAMMA-ANALYSE

Ein bedeutendes Ziel molekularpharmakologischer Untersuchungen ist - neben der Aufklärung von Wirkungsmechanismen - der Versuch, die Wirkorte von Pharmaka möglichst exakt zu lokalisieren. Für membranwirksame Pharmaka wie im Fall der hier untersuchten Verbindungen gibt es grundsätzlich die Möglichkeit extra- oder intrazellulärer Angriffspunkte (→ Rezeptorstrukturen an der Außen- oder Innenseite der Membran).

Ein neuartiges und vielseitiges Analysenverfahren hat sich in jüngster Zeit als besonders geeignet erwiesen, zur Klärung solcher Fragestellungen beizutragen. Es handelt sich hierbei um die sogenannte Laser-Mikrosonden-Massenanalyse (kurz: LAMMA-Analyse). Diese Methode wurde von den Arbeitsgruppen um KAUFMANN und HILLENKAMP in den letzten Jahren entwickelt (KAUFMANN et al., 1981; HILLENKAMP et al., 1975). Das technische Konzept wird ausführlich an anderer Stelle beschrieben (KAUFMANN et al., 1979); eine schematische Darstellung des Aufbaus eines LAMMA-Geräts gibt Abb. 6. Der Strahl eines gütegeschalteten Leistungsimpulslasers (Nd-YAG-Laser) wird mit Hilfe eines hochwertigen optischen Mikroskops bis zu einem Durchmesser von < 1 µm auf die Probe (Dünnschnitt, Herstellung siehe unten) fokussiert; das Mikroskop dient gleichzeitig zum Betrachten der Probe. Die Leistungsdichte des Lasers kann zwischen 10^5 und 10^{11} W/cm^2 so eingestellt werden, daß Probenvolumina von 10^{-13} cm^3 analysiert werden können. Ein zum Strahl des Nd-YAG-Lasers kollinear eingespiegelter He-Ne-Laser erlaubt, den Fokuspunkt zu markieren und durch XY-Manipulation der Probe den Analysenort festzulegen. Durch Wechselwirkung des Laserlichts ($\lambda = 265$ nm) mit der ausgewählten Mikroprobe wird das Probenmaterial verdampft und teilweise ionisiert. Die so erhaltenen Bruchstücke und Ionen werden mit Hilfe eines Flugzeit-Massenspektrometers analysiert und auf einem Schreiber registriert. Bei der laserinduzierten

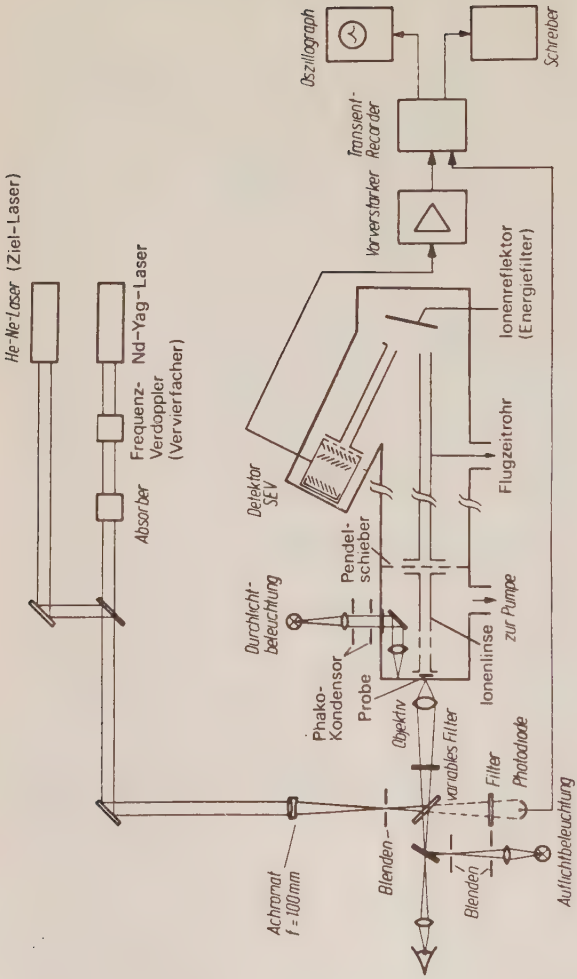


Abb. 6: Schematische Darstellung des Aufbaus eines LAMMA-Geräts.

Ionenbildung entstehen sowohl positiv wie negativ geladene Ionen; aus diesem Grunde sind alle Potentiale der Spektrometerelektroden umkehrbar und so Spektren beider Ionentypen erhältlich.

Probenherstellung:
Katzenpapillarmuskeln werden - wie unter 2.1.1 im einzelnen beschrieben - präpariert und im Versuchsbad (siehe auch 2.1.2.) über einen Zeitraum von 2 Stunden bei einer Reizfrequenz von 30/min fluorierten Derivaten der Untersuchungssubstanzen (2×10^{-3} M) ausgesetzt. Im Perfusionsmedium befindet sich außerdem zur Markierung des Extrazellulärraums Ioxaglinsäure in einer Konzentration, die einem Jodgehalt von 10^{-3}M entspricht.
Die so behandelten Muskeln werden nach Versuchsende entnommen und in einer Petrischale unter Tyrodelösung mit Minutienstiften auf Weich-PVC aufgespannt. Anschließend wird die Probe schockgefroren. Zu diesem Zweck ist in einem Exsikkator ein wärmeisolierter PVC-Behälter mit flüssigem Stickstoff gefüllt worden. Durch den Unterdruck, von einer Vakuumpumpe erzeugt, bildet sich "Stickstoff-Eis", in das nach Belüftung des Exsikkators die Probe überführt wird.
Danach wird die Muskelprobe unter Stickstoffdeckung in kleinere Stückchen zerteilt und in Gelatinekapseln überführt, die sich im Probenteller einer Tieftemperatur-Trockungsanlage befinden. Die Gefrier-Trocknung wird bei -90° C über mehrere Tage durchgeführt. Nach Trocknung wird der Probenteller langsam auf Zimmertemperatur aufgeheizt und die Gelatinekapseln werden (noch im Vakuum) mit Einbettungsmedium (Epoxyharz) gefüllt. Nach Polymerisation des Harzes können geeignete Dünnschnitte mit dem Ultra-Mikrotom hergestellt werden.

2.3. DIE HANSCH ANALYSE

2.3.1. Die molekularpharmakologische Bedeutung

Die theoretischen pharmakologischen Grundlagen, auf denen die quantitative Formulierung von Arzneistoffwirkungen, wie beispielsweise die HANSCH-Gleichung, basiert, lassen sich am besten mit Hilfe des Wahrscheinlichkeitsmodells beschreiben, das von McFARLAND (1971) vorgeschlagen wurde. Diese Modell postuliert die folgenden drei Einzelschritte als notwendige Voraussetzungen zur Auslösung eines pharmakologischen Effekts:

1) Der Arzneistoff gelangt durch passiven Transport in die Nähe des jeweiligen Rezeptors (= random walk-Passage durch Zellmembranen bis ins Rezeptorkompartiment);

2) durch Wechselwirkung zwischen Arzneistoff und Rezeptor wird ein Arzneistoff-Rezeptor-Komplex ausgebildet, der einen biologischen Effekt hervorruft; oder

3) Folge der Komplexbildung kann eine chemische Reaktion sein, die dann zur Auslösung der biologischen Antwort führt.

Im jeweiligen Fall einer spezifischen Arzneistoffwirkung muß nicht jeder dieser Einzelschritte geschwindigkeitsbestimmend oder begrenzend sein. Die Gesamtwahrscheinlichkeit, daß ein Pharmakonmolekül die obengenannten Teilschritte der Arzneistoffwirkung durchläuft, entspricht dem Produkt aus den Teilwahrscheinlichkeiten für die Einzelschritte:

$$P_{ges.} = P_1 \times P_2 \times P_3 \qquad (2.1)$$

Wenn M_o die Gesamtzahl der applizierten Moleküle und C_o die entsprechende molare Konzentration darstellen, dann errechnet sich die Zahl derjenigen Moleküle, die alle 3 Teilschritte durchlaufen (M^*), wie folgt:

$$M^* = P_{ges.} \times M_o = k \times C_o \times P_1 \times P_2 \times P_3 \qquad (2.2)$$

Da die Anzahl der benötigten Moleküle, um einen standardisierten pharmakologischen Effekt zu erzielen, für eine homologe Serie von Wirkstoffmolekülen die gleiche ist, stellen M^* und k für jedes Mitglied einer Derivatereihe Konstanten dar. Die Wirkstoff-Variablen sind C_o und die Teilwahrscheinlichkeiten (P_1, P_2, P_3).

Durch Umformen und Logarithmieren von Gleichung (2.2) erhält man:

$$C_o = \frac{M^*}{k} \times \frac{1}{P_1 \times P_2 \times P_3} \qquad (2.3)$$

$$1/C_o = \frac{k}{M^*} \times P_1 \times P_2 \times P_3 \qquad (2.4)$$

$$\log 1/C_o = k' + \log P_1 + \log P_2 + \log P_3 \qquad (2.5)$$

Im nächsten Schritt ist es nun erforderlich, die Teilwahrscheinlichkeiten der aufgeführten Einzelprozesse anhand bekannter, thermodynamischer Zusammenhänge mit der jeweiligen Freien Energie der Wechselwirkung in Beziehung zu setzen, d.h. sie mit den physiko-chemischen Eigenschaften der Wirkstoffmoleküle bzw. den substituentenbedingten Änderungen dieser physiko-chemischen Eigenschaften zu verknüpfen.

Der Arzneistofftransport zum Rezeptor

Für die große Mehrheit der heute gebräuchlichen Pharmaka gilt, daß sie Membranen mit Hilfe von passiven Transportmechanismen permeieren, d.h. die Moleküle werden durch Lipidstrukturen an der einen Seite der Membran aufgenommen und auf der anderen Seite durch die wäßrige Phase "rückextrahiert". Dieser Vorgang wiederholt sich in gleicher Weise an jeder Membran zwischen dem Ort der Arzneistoffapplikation und dem Rezeptorkompartiment. Die Fähigkeit des Arzneistoffmoleküls, in die Lipidstrukturen der Membran aufgenommen zu werden, korreliert mit der hydrophoben Bindungskapazität des Pharmakons, die quantitativ zum Beispiel durch den Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffi-

zienten beschrieben wird (LEO et al., 1971). Die Fähigkeit, diese Fettphase wieder zu verlassen, ist in entsprechender Weise umgekehrt zur Lipophilie korreliert. Aus diesen Überlegungen leiteten HANSCH und FUJITA (1964) ihre Argumente für die Existenz eines optimalen Verteilungskoeffizienten für eine congenere Serie von Pharmakonmolekülen ab: Nicht zu hydrophil, als daß die Fähigkeit der Aufnahme in die Fettphase eingeschränkt würde und nicht zu lipophil, als daß die Möglichkeit der Rückextraktion durch die wäßrige Phase reduziert würde. Durch experimentelle Überprüfung dieser theoretischen Ansätze konnten HANSCH und Mitarbeiter zeigen (HANSCH et al., 1968):

Die Wahrscheinlichkeit, daß ein Arzneistoffmolekül nach einer oder mehreren Membranpassagen seinen Rezeptor erreicht, ist eine parabolische Funktion des entsprechenden Verteilungskoeffizienten. Für die Teilwahrscheinlichkeit P_1 ergibt sich damit folgender Zusammenhang:

$$\log P_1 = a(\log VK)^2 + b(\log VK) + c \qquad (2.6)$$

Durch Anwendung der Substituentenkonstanten π kann man auch formulieren:

$$\log P_1 = a\pi^2 + b\pi + k' \qquad (2.7)$$

Die Bildung des Arzneistoff-Rezeptor-Komplexes

Die Bildung des Arzneistoff-Rezeptor-Komplexes ist eine Gleichgewichtsreaktion folgender Art:

$$A + R \rightleftharpoons AR$$

wobei A das Arzneistoffmolekül, R den Rezeptor und AR den Komplex zwischen beiden bezeichnet. Die Wahrscheinlichkeit der Komplexbildung ist gegeben durch:

$$P_2 = \frac{[AR]}{[A] + [AR]} \qquad (2.8)$$

Die Gleichgewichtskonstante K_A für die Komplexbildung ist definiert als:

$$K_A = \frac{[AR]}{[A][R]} \qquad (2.9)$$

Die Vorgänge bei der Bildung des Arzneistoff-Rezeptor-Komplexes kann man als Spezialfall eines Verteilungsprozesses auffassen. Das Arzneistoffmolekül, das vor der Komplexbildung durch Wassermoleküle solvatisiert wird, wird nun durch den Rezeptor solvatisiert; die Stabilität des Komplexes und damit K_A ergibt sich aus der Differenz der Freien Energie der beiden Zustände.
Dividiert man Gleichung (2.8) durch die Arzneistoffkonzentration [A], erhält man:

$$P_2 = \frac{[AR]/[A]}{[AR]/[A] + 1} \qquad (2.10)$$

Da $[AR]/[A] = K_A|R|$, ergibt sich:

$$P_2 = \frac{K_A[R]}{K_A[R] + 1} \qquad (2.11)$$

Wenn $[R]K_A \gg 1$, dann nähert sich $P_2 \longrightarrow 1$, d.h. ein Arzneistoff mit hoher Affinität zum Rezeptor wird bei Vorhandensein einer großen Zahl von Rezeptoren mit großer Wahrscheinlichkeit im Komplex vorgefunden werden. Mit anderen Worten, unter diesen Umständen kann dieser Schritt der Arzneistoffwirkung nicht begrenzend oder geschwindigkeitsbestimmend für seine Funktion sein, da bei $P_2 \longrightarrow 1$, log P_2 gegen Null strebt.

Ist dagegen $K_A[R] \ll 1$, dann geht Gleichung (2.11) über in:

$$P_2 = K_A[R] \qquad (2.12)$$

Da [R] in einem definierten biologischen Testsystem eine Konstante ist, hängt die Teilwahrscheinlichkeit P_2 nur von der Affinitätskonstanten K_A ab:

$$\log P_2 = \log K_A + k'' \qquad (2.13)$$

Versucht man nun, Strukturparameter zu finden, die die Variation in K_A für eine congenere Reihe von Arzneistoffen quantitativ zu beschreiben vermögen, muß man sich vergegenwärtigen, daß log K_A der Änderung in der Freien Energie (ΔG) bei der Arzneistoff-Rezeptor-Komplexierung direkt proportional ist. ΔG ist hierbei die Summe aller Änderungen in der Freien Energie der Vorgänge, die mit der Bindung des Arzneistoffs an den Rezeptor zusammenhängen. Die wichtigsten Bindungskräfte sind:

Hydrophobe Bindung, Ion-Dipol-Wechselwirkung, elektrostatische Anziehung, Wasserstoffbrücken-Bindung, Van-der-Waals-Wechselwirkung und sterische Effekte. Die zur Beschreibung dieser Bindungskräfte entwickelten Substituentenparameter (wie z.B. α, μ, σ, E_s, π) können dementsprechend in die Definitionsgleichung der Teilwahrscheinlichkeit P_2 anstelle von log K_A eingesetzt werden.

Die Reaktion des Arzneistoff-Rezeptor-Komplexes

Der letzte Einzelschritt in diesem Modell der Arzneistoffwirkung befaßt sich mit möglichen chemischen Reaktionen als Folge der Komplexbildung zwischen Arzneistoff und Rezeptor. In vielen Fällen, z.B. bei allen kompetitiven Antagonisten, ist die Bildung des Arzneistoff-Rezeptor-Komplexes ausreichend für die Auslösung des spezifischen pharmakologischen Effektes, d.h. Bildung und Reaktion des Komplexes sind hier synonym. Für eine Vielzahl anderer Arzneistoffwirkungen gilt dieser Zusammenhang jedoch nicht. Vielmehr müssen gewisse Transformationen am Arzneistoff-Rezeptor-Komplex erfolgen. Diese können darin bestehen, daß z.B. kovalente Bindungen geknüpft oder gelöst werden, oder daß ein katalytischer Effekt ausgelöst wird.

Allgemein läßt sich eine Reaktion des Arzneistoff-Rezeptor-Komplexes wie folgt ausdrücken:

$$AR \rightleftharpoons [AR]^* \longrightarrow \text{Produkt(e)} \qquad (2.14)$$

$[AR]^*$ bedeutet hierbei den energiereichen Übergangszustand in der Reaktionsfolge. Die Gleichgewichtskonstante für den Übergang von $[AR]$ zu $[AR]^*$ ist definiert als:

$$\frac{[AR]^*}{[AR]} = K \qquad (2.15)$$

Die Wahrscheinlichkeit für die Besetzung des Übergangszustandes ist gegeben durch:

$$P_3 = \frac{[AR]^*}{[AR]^* + [AR]} \qquad (2.16)$$

Teilt man die Gleichung (2.16) durch $[AR]$, gilt:

$$P_3 = \frac{[AR]^*/[AR]}{[AR]^*/[AR] + 1} = \frac{K}{K + 1} \qquad (2.17)$$

Wenn $K \gg 1$, dann strebt P_3 gegen 1, d.h. die Wahrscheinlichkeit für die Reaktion wird groß, Schritt 3 wird nicht geschwindigkeitsbestimmend. Log P_3 strebt entsprechend gegen O und leistet damit keinen Beitrag zur Gesamtwahrscheinlichkeit P.
Wenn dagegen $K \ll 1$, dann nähert sich $P_3 \longrightarrow K$ und es gilt in diesem Fall:

$$\log P_3 = \log K \qquad (2.18)$$

Da Werte für K im allgemeinen weder bekannt noch bestimmbar sind, müssen in diesem extrathermodynamischen Modell Relativwerte von Geschwindigkeits- oder Gleichgewichtskonstanten chemischer Reaktionen verwendet werden, die das Geschehen im biologischen Testsystem sinnvoll simulieren.

Beispiele für solche eng mit der chemischen Reaktivität verknüpften Substituentenkonstanten sind unter anderem die HAMMETT- bzw. TAFT-Parameter. Durch entsprechende Substitution kann man Gleichung (2.18) also auch wie folgt formulieren:

$$\log P_3 = c \cdot \sigma + k''' \qquad (2.19)$$

Für die 3 Teilwahrscheinlichkeiten im McFARLAND-Modell wurden damit die folgenden molekularpharmakologischen Beziehungen abgeleitet:

$$\log P_1 = a\pi^2 + b\pi + k' \qquad (2.20)$$

$$\log P_2 = \log K_A + k'' \qquad (2.21)$$

$$\log P_3 = c\cdot\sigma + k''' \qquad (2.22)$$

Durch Einsetzen in Gleichung (2.5) erhalten wir auf diese Weise eine allgemeine Gleichung (HANSCH-Gleichung):

$$\log 1/C = a\pi^2 + b\pi + \log K_A + c\cdot\sigma + k \qquad (2.23)$$

die es erlaubt, Änderungen in der biologischen Wirkung von Derivaten einer congeneren Serie als Funktion von physikochemischen Strukturparametern quantitativ zu formulieren.

Die bisherigen Betrachtungen haben im wesentlichen die molekularpharmakologischen Grundlagen quantitativer Struktur-Wirkungsanalysen berücksichtigt; im folgenden soll auf die thermodynamischen Beschreibungen chemischer Gleichgewichte eingegangen werden. Danach ist der Logarithmus der Gleichgewichtskonstanten einer chemischen Wechselwirkung, wie z.B. der Anlagerung eines Arzneistoffs an ein Rezeptormolekül, proportional zur Änderung der Gibbs'schen Freien Energie ΔG bei dieser Wechselwirkung:

$$\Delta G = - RT \ln K_A \qquad (2.24)$$

Voraussetzung für die Durchführbarkeit von Struktur-Wirkungsanalysen im oben beschriebenen Sinne ist die Annahme eines Postulats, wie HANSCH und DEUTSCH (1966) es aufgestellt haben. Danach ist ΔG additiv in physiko-chemisch definierte Teilbeiträge faktorisierbar und das Ausmaß der Änderung der Freien Energie ΔG für die Wechselwirkung einer Reihe von Abwandlungsprodukten mit einem Rezeptormolekül kann Substituentenbeiträgen des jeweiligen Derivates zugeordnet werden:

$$- RT \ln K_A = \Delta G_{\text{hydrophob}} + \Delta G_{\text{elektronisch}} + \Delta G_{\text{sterisch}} \qquad (2.25)$$

Damit sind die Änderungen der Freien Energie einer chemischen Wechselwirkung (= Arzneistoff-Rezeptor-Wechselwirkung) quantitativ beschreibbar durch die physikalisch-chemischen Substi-

tuentenparameter, die im nächsten Abschnitt im einzelnen beschrieben werden.

Da das Postulat von HANSCH und DEUTSCH thermodynamisch nicht belegbar ist, wird das HANSCH-Verfahren auch als "extrathermodynamische" Analyse bezeichnet.
Eine weitere wichtige Einschränkung für die Gültigkeit von HANSCH Analysen ergibt sich aus dem 2. Hauptsatz der Thermodynamik. Danach ist die Änderung der Gibbs'schen Freien Energie sowohl von der Reaktionsenthalpie als auch von der Reaktionsentropie abhängig:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad (2.26)$$

HANSCH Analysen können damit nur auf Serien angewandt werden, innerhalb derer die Entropie oder die Entropie-Änderung bei der Rezeptor-Wechselwirkung für alle Glieder der Serie konstant bleibt.

.2. Die Substituentenparameter

Die Wechselwirkung eines Arzneistoffs mit einem Rezeptor setzt die folgenden grundsätzlichen physikalisch-chemischen Bedingungen voraus:

1) Das Arzneistoffmolekül muß über einen geeigneten Fett-/Wasser-Verteilungskoeffizienten verfügen, damit eine ausreichende Konzentration in der Rezeptorphase ermöglicht wird;

2) das Arzneistoffmolekül muß eine günstige "rezeptorkomplementäre" Ladungsverteilung aufweisen, damit ausreichende Bindungskräfte auftreten können;

3) das Arzneistoffmolekül muß eine geeignete räumliche Struktur besitzen, die eine optimale konformative Anpassung an die Rezeptorgeometrie erlaubt.

Hieraus ergeben sich unmittelbar Art und Einteilung der physikalisch-chemischen Substituentenparameter, die geeigneterweise zur quantitativen Beschreibung von Arzneistoff-Rezeptor-Wechselwirkungen herangezogen werden:

1) elektronische Parameter,
2) sterische Parameter,
3) lipophile Parameter.

2.3.2.1. Elektronische Substituentenparameter

Die bei weitem wichtigste Größe zur Quantifizierung elektronischer Substituenteneigenschaften ist die HAMMETT- oder σ-Konstante, die die elektronenziehenden bzw. -schiebenden Eigenschaften in Bezug auf ein Reaktionszentrum beschreibt (HAMMETT, 1973).
Die sogenannte HAMMETT-Gleichung verknüpft für eine Vielzahl chemischer Reaktionen von aromatischen Verbindungen die Gleichgewichts- oder die Geschwindigkeitskonstanten der substituierten Verbindungen mit den entsprechenden Konstanten der unsubstituierten Verbindungen. Sie sagt aus, daß die logarithmische relative Geschwindigkeit bzw. Gleichgewichtslage einer Reaktion (bezogen auf die unsubstituierte Standardverbindung mit X = H) einem Substituentenparameter (σ) und einem Reaktionsparameter (ρ) proportional ist. Für die Dissoziation von unterschiedlich substituierten Benzoesäurederivaten im Vergleich zu unsubstituierter Benzoesäure gilt zum Beispiel:

$$\log K_X = \log K_H + \rho\sigma \qquad (2.27)$$

oder

$$\frac{\log K_X}{\log K_H} = \rho\sigma \qquad (2.28)$$

Über die Messung der Konstanten K_X und K_H ist damit der Einfluß eines Substituenten X auf die Reaktivität der Ausgangsverbindung leicht quantifizierbar. Die so ermittelte Substituentenkonstante σ steht in einer linearen Proportionalitätsbeziehung zur Freien Energie ΔG und es gelten die oben

bereits angeführten Einschränkungen bezüglich Gültigkeit bzw. Aussagekraft der numerischen Werte.

Der σ-Wert von Wasserstoff ist definitionsgemäß gleich Null. Jeder Substituent, der stärker elektronenziehend wirkt als Wasserstoff, hat einen positiven σ-Wert. Substituenten, die stärker elektronenschiebend wirken, haben negative σ-Werte.

Die Beeinflussung der Ladungsverteilung in Molekülen durch Substituenten, wie sie quantitativ der σ-Wert wiedergibt, kann auf zwei grundsätzlich unterschiedlichen Substituenteneigenschaften beruhen: dem sogenannten Feld- oder induktiven Effekt einerseits und dem Resonanz- oder mesomeren Effekt andererseits.

Induktive Effekte beschreiben die Verschiebung von Bindungselektronen in Einfachbindungen (σ-Elektronen) in Richtung des stärker elektronegativen Bindungspartners. Mesomere Effekte hingegen charakterisieren die Störung der π-Elektronendichte an Atomen in konjugierten Systemen. Je nachdem, ob die Elektronenverschiebung zum Substituenten hin oder vom Substituenten weg erfolgt, spricht man von negativ induktiven (bzw. mesomeren) oder von positiv induktiven Effekten. In Struktur-Wirkungs-Analysen werden aus den hier dargelegten Gründen anstelle der Substituentenkonstante σ häufig entsprechende Feldkonstanten (= F-Werte) bzw. Resonanzkonstanten (= R-Werte) eingesetzt. Signifikante Korrelationen mit diesen Substituentenkonstanten deuten auf die Beteiligung von Ion-Ion- bzw. Ion-Dipol-Wechselwirkungen an der Arzneistoff-Rezeptor-Interaktion hin. Weitere molekular-pharmakologisch relevante Bindungskräfte werden durch das Dipolmoment μ (→ Dipol-Dipol-Interaktionen) sowie die Polarisierbarkeitskonstante α (→ induzierte Dipol-Dipol-Interaktionen) repräsentiert.

2.3.2.2. Sterische Substituentenparameter

Unter den Substituentenkonstanten, die zur Charakterisierung der räumlichen Anpassung von Arzneistoffen an Rezeptoren dienen, wird der E_s-Wert nach TAFT am häufigsten angewandt. Zur Definition dieses Parameters wurde in Analogie zur HAMMETT-Gleichung die TAFT-Gleichung abgeleitet. Dabei machte man sich die Tatsache zunutze, daß bei der sauren Hydrolyse substituierter Benzoesäureethylester der Wert für die Reaktionskonstante ρ nahezu Null ist. Mit anderen Worten, die Hydrolysegeschwindigkeit einer solchen Derivatereihe ist nahezu unabhängig von elektronischen Substituenteneigenschaften. TAFT übertrug diese Verhältnisse auf die saure Hydrolyse aliphatischer Carbonsäureester und führte die beobachteten Variationen der Hydrolysegeschwindigkeit dieser Ester auf sterische Substituenteneffekte zurück:

$$\log \left(\frac{k_R}{k_{CH_3}}\right) = E_S \qquad (2.29)$$

Als Bezugspunkt diente die Hydrolyserate für Essigsäuremethylester. Die E_S-Konstanten spiegeln einen allgemeinen Abschirmeffekt eines Reaktionszentrums durch Substituenten wider. Je stärker dieser Effekt, d.h. je "größer" der Substituent, desto kleiner ist der entsprechende E_S-Wert.

KUTTER und HANSCH (1969) konnten die sterische Bedeutung von E_S belegen und seine Anwendbarkeit noch erweitern, indem sie eine statistisch signifikante Beziehung zwischen E_S und dem Mittelwert von Maximal- und Minimalradius verschiedener Substituenten belegen konnten:

$$E_S = - 1.839\ r_v + 3.484 \qquad (2.30)$$

Der wichtigste neuere Beitrag zur präzisen Quantifizierung sterischer Effekte wurde von VERLOOP und Mitarbeitern (1976)

geleistet. Aus Standardbindungslängen und -bindungswinkeln konnten sie für 243 Substituenten einen Satz von 5 neuen Substituentenkonstanten erstellen, der das umfangreichste heute verfügbare Datenmaterial über sterische Substituenteneffekte darstellt. Die maximale Ausdehnung des Substituenten in Richtung der Bindungsachse Ausgangsmolekül-Substituent - in der Publikation als X gekennzeichnet - wird als Substituentenlänge L definiert. Durch Rotation um die X-Achse wird die kürzeste Entfernung in Richtung Z-Achse ermittelt (= B_1). Die Parameter B_1 - B_4 stellen, nach zunehmender Größe geordnet, die Abstände zwischen der X-Achse und parallelen Tangentialebenen dar, die senkrecht zur Y- bzw. Z-Achse liegen.

Neben den bisher beschriebenen sterischen Parametern sind noch das Molvolumen nach EXNER (1967) sowie die Molrefraktion von Bedeutung. Das Molvolumen wurde 1967 von EXNER aus Dichtemessungen homologer Verbindungsreihen bestimmt und ist definiert als der Quotient aus Molmasse und Dichte:

$$MV = \frac{MG}{d} \quad \left[\frac{cm^3}{mol}\right] \qquad (2.31)$$

Die Molrefraktion MR kann zum Beispiel aus der Lorentz-Lorenz-Gleichung ermittelt werden:

$$MR = \frac{MG}{d} \quad \frac{(n^2-1)}{(n^2+2)} \quad \left[\frac{cm^3}{mol}\right] \qquad (2.32)$$

n = Brechungsindex

4.2.3. Lipophile Substituentenparameter

Lipophile Arzneistoffeigenschaften beeinflussen in zweierlei Hinsicht das molekularpharmakologische Verhalten von Pharmaka:

der Transport des Arzneistoffs vom Ort der Applikation zum Ort der Wirkung ist im wesentlichen eine Funktion des Lipid-Wasser-Verteilungsverhaltens; darüberhinaus können hydrophobe Wechselwirkungen signifikant zur Arzneistoff-Rezeptor-Interaktion beitragen.

Die ersten erfolgreichen Beiträge zur quantitativen Charakterisierung lipophiler Substituenteneigenschaften leistete die Arbeitsgruppe von HANSCH. Sie beschrieb die biologische Wirksamkeit einer Verbindung unter anderem als eine Funktion des Verteilungskoeffizienten dieser Verbindung zwischen einer wäßrigen und einer Lipidphase. Da auch der Verteilungskoeffizient P eine Gleichgewichtskonstante darstellt, ist der Logarithmus des Verteilungskoeffizienten der Änderung der Freien Energie ΔG beim Übergang eines Moleküls von der Lipid- in die wäßrige Phase direkt proportional:

$$\Delta G = - RT \ln P \qquad (2.33)$$

Um den Beitrag von Substituenten zur Gesamtlipophilie von Pharmaka charakterisieren zu können, definierte die Arbeitsgruppe von HANSCH in Analogie zur HAMMETT'schen σ-Konstante und zum TAFT'schen E_s-Wert die neue Hydrophobie-Konstante π durch die Gleichung:

$$\log \frac{P_{R-X}}{P_{R-H}} = \pi_X \qquad (2.34)$$

Erhöht ein Substituent (x) die Gesamtlipophilie einer unsubstituierten Ausgangsverbindung, so nimmt π positive Werte an und umgekehrt.

Aus Gleichung (2.33) geht hervor, daß auch der Einfluß eines Substituenten auf die Lipophilie der Ausgangsverbindung durch eine "lineare Freie-Energie-Beziehung" ausgedrückt werden kann:

$$\log \frac{P_{R-X}}{P_{R-H}} = - \frac{1}{2.3RT} \cdot \Delta\Delta G = k\Delta\Delta G = \pi_X \qquad (2.35)$$

Neben der Ermittlung von Verteilungskoeffizienten stellt die experimentelle Bestimmung der sogenannten R_M- bzw. ΔR_M-Werte die wichtigste Möglichkeit dar, um quantitativ Lipophiliebeiträge von Substituenten zu erfassen. Dieses Verfahren besteht in der Messung von R_f-Werten aus Phasenumkehr- Dünnschichtchromatogrammen mit anschließender Umrechnung in R_M-Werte. Die genannte Methode wurde von BOYCE und MILBORROW (1965) sowie der Arbeitsgruppe um BIAGI (BIAGI et al., 1969, 1970, 1975) entwickelt; dabei werden silanisierte Dünnschichtplatten mit Paraffin- oder Silikonöl als lipophiler stationärer Phase vorbehandelt, während als mobile, hydrophile Phase ein Gemisch aus Wasser und organischen Solventien unterschiedlicher Zusammensetzung verwendet wird. Es handelt sich also auch bei diesem Verfahren um eine Verteilung der untersuchten Arzneistoffe zwischen einer Lipid- und einer Wasserphase.

Für jeden Untersuchungsstoff lassen sich aus den so erhaltenen Chromatogrammen R_f-Werte berechnen, wobei R_f das Verhältnis der Laufstrecken von untersuchter Substanz zu mobiler Phase charakterisiert. Die bereits erwähnten R_M-Werte lassen sich dann nach folgender Formel berechnen:

$$R_M = \log \frac{(1 - R_f)}{R_f} \qquad (2.36)$$

Der R_M-Wert stellt also den Logarithmus des Quotienten derjenigen Strecke, die ein Arzneistoff hinter der Laufmittelfront zurückgeblieben ist (= Maß für die Wechselwirkung mit der lipophilen, stationären Phase) zur R_f-Strecke dar (= Maß für Vorwärtsbewegung mit der mobilen, hydrophilen Phase). Aus der Verwendung von R_M-Werten ergibt sich, daß man bei R_f-Werten < 0.5 positive R_M-Werte erhält und umgekehrt. D.h., eine Substanz ist umso lipophiler, je höher bzw. positiver der entsprechende R_M-Wert ist.

Entsprechend der Ableitung der Substituentenkonstanten aus log P-Werten läßt sich die Substituentenkonstate ΔR_M wie folgt bestimmen:

$$\Delta R_{M-X} = R_{M-RX} - R_{M-RH} \qquad (2.37)$$

RX und RH stellen auch hier wieder die substituierte (X) bzw. unsubstituierte Verbindung dar.

Abschließend sind die wesentlichen Substituentenparameter zur molekularpharmakologischen Charakterisierung von Arzneistoff-Rezeptor-Wechselwirkungen zusammengefaßt:

Strukturparameter	Molekularpharmakologische Bedeutung	Literatur
	ELEKTRONISCHE EIGENSCHAFTEN	
σ	Ion-Dipol-Interaktion	HANSCH et al., 1973
F	Feldeffektbedingter Anteil der Ion-Dipol-Interaktion	NORRINGTON et al., 1975
R	Resonanzbedingter Anteil der Ion-Dipol-Interaktion	NORRINGTON et al., 1975
μ	Dipol-Dipol-Interaktion	McFARLAND, 1971 STAAB, 1970
α	Induzierte Dipol-Dipol-Interaktion	COATS, 1973 MANNHOLD et al., (im Druck)
	STERISCHE EIGENSCHAFTEN	
E_S	Sterische Hinderung von Reaktionen	KUTTER u. HANSCH 1969 CRAIG, 1971
$B_1 - B_4$, L	Koordinatenbeschreibung der Raumerfüllung von Substituenten	VERLOOP et al., 1975
MV MR	Substituentenvolumen	EXNER, 1967
	LIPOPHILE EIGENSCHAFTEN	
π	Wirkstofftransport zum Rezeptor	HANSCH u. FUJITA, 1964
R_M	Hydrophobe Rezeptorinteraktion	BIAGI et al., 1970, 1975

Tab. 3: Übersicht der wesentlichen Strukturparameter und ihrer molekularpharmakologischen Bedeutung.

3. Die mathematischen und statistischen Grundlagen

3.1. Die multiple lineare Regressionsanalyse

Wie in Kapitel 1.3. bereits erläutert, kann die biologische Aktivität eines Pharmakons - ausgedrückt durch log $1/EC_{50}$ - mit geeigneten physikochemischen (i.e. elektronischen, sterischen und hydrophoben) Eigenschaften des Arzneistoffmoleküls in Beziehung gesetzt werden. Die Arbeiten von HANSCH und Mitarbeitern (HANSCH u. FUJITA, 1964; HANSCH u. DEUTSCH, 1966) haben auf der Grundlage von Linearen Freien Energie-Beziehungen sowie extrathermodynamischen Postulaten (HANSCH und DEUTSCH, 1966) diesen quantitativen Ansatz ermöglicht. Dementsprechend kann die gesamte Änderung der Freien Energie einer Arzneistoff-Rezeptor-Wechselwirkung in additive physikochemische Substituentenbeiträge faktorisiert werden. Die biologische Aktivität drückt man daher als Linearkombination geeigneter Parameter aus:

$$\log 1/EC_{50} \; (=X_{mi}) = k_o + k_1\pi_i + k_2\sigma_i + \ldots + k_m X_{mi} \qquad (2.38)$$

Die X_{ji} (j = 1 bis m) symbolisieren die numerischen Werte der physikochemischen Substituentenparameter, während die Regressionskoeffizienten k_j (j = 0 bis m-1) ein Maß für den Beitrag des zugehörigen Parameters darstellen.

In praxi werden für eine Ausgangsverbindung und ihre Derivate in einem geeigneten pharmakologischen Testmodell - in der vorliegenden Arbeit z.B. die negativ inotrope Wirkung am isoton kontrahierenden Katzenpapillarmuskel - die jeweiligen EC_{50}-Werte bestimmt. Für N getestete Untersuchungssubstanzen erhalten wir N Gleichungen (i = 1 bis N) der Form 2.38.

Besteht nun eine lineare Beziehung zwischen dem Einfluß der Parameter und der gemessenen Wirkung für alle untersuchten Derivate, dann können die Koeffizienten k_j, die in allen N Gleichungen identisch sind, mit Hilfe der multiplen linearen Regression bestimmt werden. Üblicherweise wendet man als Näherungskriterium für die lineare Regression das Minimum der

Abstandsquadrate an, die sich aus der Differenz der gemessenen und errechneten Werte für die Wirkung ergeben. Die N Gleichungen (2.38) lassen sich unter diesen Voraussetzungen in ein inhomogenes Gleichungssystem für die Koeffizienten k_i überführen. Man erhält:

$$\begin{aligned} a\sum_i^N 1 + k_1\sum_i^N X_{1,i} + \ldots + k_{m-1}\sum_i^N X_{m-1,i} &= \sum_i^N X_{m,i} \\ \vdots \\ a\sum_i^N X_{m-1,i} + k_1\sum_i^N X_{1,i}X_{m-1,i} + \ldots + k_{m-1}\sum_i^N X_{m-1,i}^2 &= \sum_i^N X_{m,i}X_{m-1,i} \end{aligned} \qquad (2.39)$$

Die Konstante a und die k_i erhält man nach Auflösen des Gleichungssystems, z.B. durch Anwendung des Gauß'schen Algorithmus.

Die Güte der multiplen linearen Regression läßt sich anhand verschiedener Kriterien abschätzen; unter anderem eignet sich die Standardabweichung $\sqrt{s^2}$, zwischen den experimentell ermittelten und den durch Regressionsgleichungen errechneten log $1/EC_{50}$-Werten:

$$S = \left(\frac{1}{N-P-1}\sum_{i=1}^{N}(Y_i - Y_i)^2\right)^{1/2} \qquad (2.40)$$

Der Freiheitsgrad F ist hierbei definiert als F = N-P-1, wobei N die Anzahl der untersuchten Verbindungen und P die eingesetzten physikochemischen Parameter bedeuten.

Die Aussagekraft der Ergebnisse multipler linearer Regressionsanalysen ist in hohem Maße davon abhängig, ob man den Beitrag des einzelnen Substituentenparameters zur endgültigen Regression korrekt quantitativ ausdrücken kann. Anhand der üblichen Regressionskoeffizienten k_j ist eine solche Bewertung nicht möglich:
die für QSWA eingesetzten physikochemischen Parameter sind dimensionsbehaftet und ihre numerischen Beträge überstreichen sehr unterschiedliche Größenordnungsbereiche. Ein quantitatives Maß für den Einfluß eines Parameters auf den phar-

makologischen Effekt erhält man nur durch Einführung standardisierter Parameter mit der entsprechenden Ableitung standardisierter Regressionskoeffizienten.

3.2. Das Normierungsverfahren für Substituentenparameter

Die Vorteile, standardisierte Parameter in multiplen linearen Regressionsanalysen anzuwenden, wurden ausführlich von MANNHOLD (1977), MANNHOLD und Mitarbeitern (1978) sowie MAGER und BARTH (1979) beschrieben. Die Standardisierung wird auf folgende Art und Weise vorgenommen: die numerischen Beträge der physikochemischen Parameter und der biologischen Wirksamkeit werden durch Werte ersetzt, die entsprechend folgender Gleichung berechnet werden:

$$x_i' = \frac{x_i - \bar{x}_i}{s_i} \qquad (2.41)$$

(x_i = standardisierter X-Wert; $\bar{x}_i$ = Mittelwert aller ausgewählten Substituenten; s_i = Standardabweichung der x_i-Werte).

Mit Hilfe dieser nunmehr dimensionslosen Größe geht das Gleichungssystem der (i = 1 bis N) Gleichungen in folgende Form über:

$$\log 1/EC_{50} = (X_{m'i}) = k_1'\pi_i' + k_2'\sigma_i' + \ldots + k_n'X_{ni}' \qquad (2.42)$$

Die so erhaltenen Koeffizienten, k_j', werden standardisierte oder normierte Regressionskoeffizienten genannt. Das Gleichungssystem nach 2.42 hat den Vorteil, daß die Regressionskoeffizienten, k_j', mit gewissen Einschränkungen vergleichbar sind und eine quantitative Information über das Maß des Einflusses eines Parameters auf die endgültige Regression ermöglichen. Wenn z.B. $k_1' < k_2'$, kann man daraus schließen, daß der Einfluß des Parameters x_{i1} entsprechend kleiner ist als derjenige des Parameters x_{i2}.

Regressionsanalysen werden üblicherweise mit Computerhilfe durchgeführt. In diesem Zusammenhang ist es sehr nützlich,

zur Berechnung der Koeffizienten k_j' und k_j, eine Matrix der Produktsummen, S_{ij}, einzuführen:

$$D = \begin{pmatrix} S_{11} & \cdots & S_{1,m-1} \\ & S_{22} & \\ S_{m-1,1} & \cdots & S_{m-1,m-1} \end{pmatrix} \qquad (2.43)$$

Die Produktsummen berechnen sich nach folgenden Gleichungen:

$$S_{ij} = \sum (x_i - \bar{x}_i)(x_i - \bar{x}_j)$$
$$S_{ji} = \sum (x_i - \bar{x}_i)^2 \qquad (2.44)$$

Da $S_{ij} = S_{ji}$, ist die Matrix symmetrisch. Δ ist die Determinante der Matrix D und Δij die Subdeterminante von D nach Elimination der i-ten Reihe und der j-ten Zeile. Die Ausdrücke für die Regressionskoeffizienten in dieser Notation sind:

$$k_{mj} = (-1)^{m+j+1} \frac{\Delta mj}{\Delta mm}$$
$$k'_{mj} = (-1)^{m+j+1} \frac{\Delta mj}{\Delta mm} \sqrt{\frac{S_{ii}}{S_{mm}}} \qquad (2.45)$$

Aus 2.45 wird ersichtlich, daß die normalen multiplen Regressionskoeffizienten untereinander in folgender Beziehung stehen:

$$k'_{mj} = k_{mj} \sqrt{\frac{S_{jj}}{S_{mm}}} \qquad (2.46)$$

Durch Anwendung der gleichen Matrix wie in 2.43 lassen sich die partiellen Regressionskoeffizienten herleiten entsprechend:

$$r_{im} = \frac{\Delta_{im}}{(\Delta_{ii} * \Delta_{mm})^{1/2}} \qquad (2.47)$$

Der multiple Korrelationskoeffizient, R_m, ergibt sich aus:

$$R_M = \left(\frac{\sum_{i=1}^{m-1} k_{mi} \, S_{mi}}{S_{mm}} \right)^{1/2} \qquad (2.48)$$

3.3. Die statistischen Tests

Die folgenden statistischen Tests sind im Rechenprogramm berücksichtigt, um die Signifikanz der errechneten Ergebnisse zu überprüfen:

1) Die Standardabweichung, s, zwischen den experimentell ermittelten log $1/EC_{50}$-Werten und den nach Gleichung 2.39 errechneten Werten für log $1/EC_{50}$,
2) die Bereiche für die 95%-Konfidenzintervalle zu den Regressionskoeffizienten, k_j,
3) ein Student t-Test zu den partiellen Korrelationskoeffizienten, der angibt, ob die Korrelation der einzelnen Parameter mit der vorhandenen Zahl von Derivaten überhaupt sinnvoll ist, und
4) der Gesamtkorrelationskoeffizient, R_m, mit einem F-Test

$$F = \frac{(N-P-1) \, R_m^2}{P(1-R_m^2)} \qquad (2.49)$$

Der F-Test ist essentiell, um die Signifikanz der Gesamtkorrelation zwischen physikochemischen Parametern und biologischer Aktivität zu überprüfen, wobei hier wesentlich das numerische Verhältnis zwischen untersuchten Derivaten und eingesetzten Parametern in den Test eingeht.

Das multiple Bestimmtheitsmaß, R_m^2, beschreibt, zu wieviel Prozent die ausgewählten Parameter zur linearen Regression beitragen. Wenn zum Beispiel $R_m^2 = 0.87$ ist, können 87% der Varianz der biologischen Wirkung durch eine korrelative Ab-

hängigkeit zwischen Aktivität und eingesetzten Parametern erklärt werden.

2.3.3.4. Die Kriterien für die Beurteilung von Regressionsgleichungen

1) Zur Vermeidung von Zufallskorrelationen sollte das Verhältnis zwischen untersuchten Abwandlungsprodukten und eingesetzten physikalisch-chemischen Parametern 5 zu 1 nicht unterschreiten (TOPLISS und COSTELLO, 1972; TOPLISS und EDWARDS, 1979).

2) Bei Multiparameter-Beziehungen ist unbedingt darauf zu achten, daß nur nicht untereinander korrelierte Parameter in eine Regressionsanalyse einbezogen werden. Dies wird mit Hilfe von Interkorrelationsanalysen überprüft, wie sie in Kapitel 3.7.2. wiedergegeben sind. Nur auf diese Weise kann man physikalisch-chemisch sinnvolle Interpretationen von Multiparameter-Regressionsgleichungen sicherstellen (LEO et al., 1969).

3) Eine Verbesserung des numerischen Werts des Korrelationskoeffizienten durch Aufnahme eines zusätzlichen Parameters in die Analyse muß statistische Signifikanz anhand des sequentiellen F-Tests zeigen:

$$\frac{1}{t} = \frac{(R_{m2}^2 - R_{m1}^2)\ (N - P_2 - 1)}{(1 - R_{m2}^2)\ (P_2 - P_1)} \qquad (2.50)$$

R_{m2} ist der Korrelationskoeffizient für P_2 Parameter und R_{m1} derjenige für die Korrelation mit P_1 Parametern, wobei P_2 immer größer P_1 ist.

4) Bei der Auswahl der physikalisch-chemischen Parameter sollte man darauf achten, daß die verwendeten numerischen Beträge möglichst alle nach dem gleichen Verfahren ermittelt wurden.

5) Der Wertebereich für die numerischen Beträge der eingesetzten Parameter (= spanned substituent space) sollte so groß wie möglich sein, um die Aussagekraft der erhaltenen Regression zu erhöhen.

6) Die Berechtigung zur physikalisch-chemischen Interpretation eines statistisch signifikanten Korrelationsergebnisses sollte überprüft werden. Man wiederholt die Regressionsanalyse unter Auslassung einiger Derivate mit extrem hoher (bzw. niedriger) biologischer Aktivität. Wenn die zuvor erhaltene Korrelation auch für den reduzierten Datensatz gilt, sollte die angenommene physikalisch-chemische Interpretation der Ergebnisse gültig sein.

7) Es sollte das Prinzip der Einfachheit angewandt werden; sind mehrere Korrelationsgleichungen gleichwertig, dann ist das einfachste Modell zu bevorzugen.

2.4. DIE MONOPOL-BINDUNGSPOLARISIERBARKEITSMETHODE

Das unter 2.3. beschriebene Verfahren der HANSCH-Analyse kann einige Teilaspekte der Arzneistoff-Rezeptor-Wechselwirkung nicht oder nur schlecht aufklären:

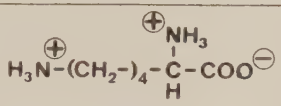
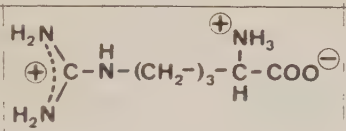
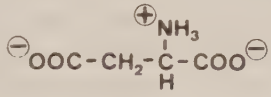
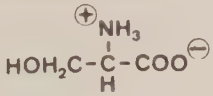
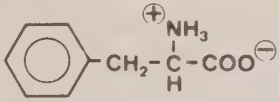
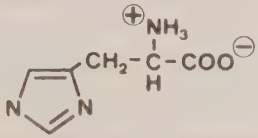
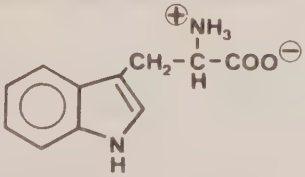
1) Mit Hilfe der HANSCH-Analyse lassen sich keine Erkenntnisse über Arzneistoffkonformationen gewinnen; damit bleiben wesentliche sterische Aspekte unberücksichtigt oder zumindest ungenügend aufgeklärt;

2) Aussagen und Erkenntnisse über die chemische Struktur des Rezeptormoleküls sind mit dem HANSCH-Ansatz nur sehr bedingt möglich.

Aus diesen Gründen hat sich in den letzten Jahren ein Verfahren durchgesetzt, das auf der Grundlage theoretischer, z.T. quantenchemischer Verfahren in hervorragender Weise zur Lösung obengenannter Fragen beizutragen vermag. Diese sogenannte Monopol-Bindungspolarisierbarkeits-Methode wurde von CLAVERIE und REIN (1969) entwickelt; sie wird in Deutschland vor allem von der Arbeitsgruppe um HÖLTJE (1974, 1975, 1981) angewandt.

Dieses relativ junge Verfahren erlaubt, auf der Grundlage von Wechselwirkungsenergieberechnungen zwischen Arzneistoffmolekülen und Modellrezeptoren Erkenntnisse über die potentielle chemische Struktur von in-vivo-Bindungsstellen zu gewinnen.

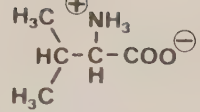
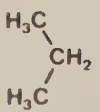
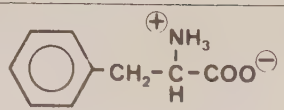
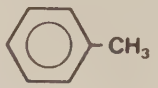
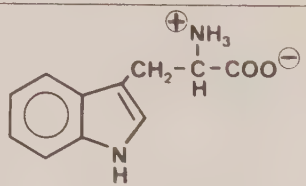
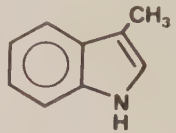
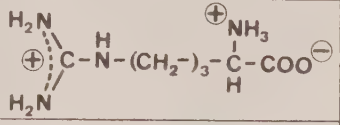
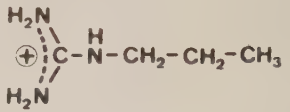
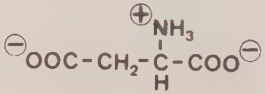
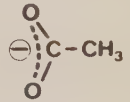
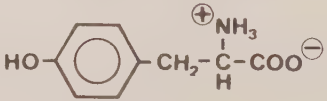
Es gilt heute als gesichert, daß die überwiegende Zahl der Rezeptoren für Arzneistoffmoleküle definierte Bereiche von Proteinmakromolekülen sind. In Analogie zu den exakt bekannten Bauplänen vieler Enzyme kann man davon ausgehen, daß an der Oberfläche dieser Proteinmakromoleküle gehäuft Aminosäuren mit polaren Resten (z.B. Lysin, Arginin, Tryptophan oder Asparaginsäure) anzutreffen sind (siehe auch Tab. 4). Es wird angenommen, daß diese polaren Gruppen hypothetische sekundäre Bindungsstellen für Arzneistoffmoleküle bzw. deren Substituenten darstellen. Wie im einleitenden Kapitel

Aminosäure	Strukturformel	Chemische Bezeichnung	Phys.chem. Eigenschaft
Lysin		α,ϵ-Diaminocapronsäure	hydrophil
Arginin		α-Amino-δ-guanidinovaleriansäure	hydrophil
Asparaginsäure		α-Aminobernsteinsäure	hydrophil
Serin		α-Amino-β-hydroxypropionsäure	hydrophil
Phenylalanin		α-Amino-β-phenylpropionsäure	hydrophob
Histidin		α-Amino-β-imidazolpropionsäure	hydrophil
Tryptophan		α-Amino-β-indolylpropionsäure	hydrophob

Tab. 4: Aminosäuren, die bevorzugt an Enzymoberflächen anzutreffen sind und geeignete Wechselwirkungspartner für Arzneistoffmoleküle darstellen.

über qualitative und quantitative Struktur-Wirkungsanalysen bereits ausgeführt, sind ausschließlich die Wechselwirkungen mit sekundären Bindungsstellen quantitativen Analysen zugänglich. Nur hier ist die entscheidende Grundbedingung einer unterschiedlichen Wirkstärke von Derivaten bei identischem Wirkungsmechanismus erfüllt. Der sekundäre Strukturbereich von Pharmaka ist in bestimmten Grenzen gegen chemische Variation unempfindlich. Seine Hauptaufgabe besteht darin, durch zusätzliche Bindungskräfte die Lebensdauer des Pharmakon-Rezeptor-Komplexes zu verlängern und damit die Wirkstärke des Pharmakons zu erhöhen. Aus diesen Zusammenhängen wird leicht ersichtlich, daß für sekundäre Bindungsstellen eine enge Beziehung zwischen der pharmakologischen Potenz von Arzneistoffderivaten und ihren entsprechenden Wechselwirkungsenergien mit Rezeptorstrukturen besteht.
Basierend auf diesen Vorstellungen können Wechselwirkungsenergien zwischen sekundären Bindungsstellen von Derivatereihen und Rezeptormodellen berechnet und die errechneten Bindungsenergien mit der biologischen Aktivität der Derivate korreliert werden. Derartige Korrelationen können dann aufzeigen, ob das jeweils benutzte Rezeptormodell die tatsächliche in-vivo Bindungsstelle in geeigneter Weise simuliert. Als Rezeptormodelle bieten sich - wie oben bereits ausgeführt - die an der Oberfläche von Proteinmakromolekülen lokalisierten polaren Bereiche von Aminosäuren an. Die im einzelnen benutzten Rezeptormodelle sind in Tab. 5 zusammengefaßt.

Möglichst umfassende Kenntnisse über die chemischen Charakteristika der nicht-reagierenden Moleküle sind die unbedingte Voraussetzung, um Art und Maß der Wechselwirkung zwischen den Molekülen erfassen zu können. Dies sind zum einen Kenntnisse über die sterischen Moleküleigenschaften anhand ausführlicher Konformationsanalysen sowie Kenntnisse der elektronischen Eigenschaften anhand von Berechnungen der Ladungsverteilung. Zur Konformationsanalyse dienen be-

Valin		aliphatische Aminosäure	n-Propan	
Phenyl-alanin		aromatische Aminosäure	Toluol	
Tryptophan		aromatische Aminosäure	3-Methyl-indol	
Arginin		basische Aminosäure	n-Propyl-guanidinium-ion	
Asparagin-säure		saure Aminosäure	Acetat-ion	
Tyrosin		Hydroxy-Aminosäure	p-Kresol	

Tab. 5 : Übersicht der wichtigsten Modellstrukturen für Rezeptorbindungsstellen, die als Bindungspartner für Wechselwirkungsenergieberechnungen herangezogen werden.

vorzugt zwei quantenchemische Verfahren: die Erweiterte-Hückel-Theorie (EHT) und die Complete Neglect of Differential Overlap Methode (CNDO/2-Verfahren). Man kann auf diese Weise den stabilsten, d.h. energieärmsten räumlichen Bau der Moleküle ermitteln. Das energieärmste Konformere ist unter allen möglichen Konformationen quantitativ am häufigsten vertreten und damit nicht nur für die Ausbildung des Primärkomplexes (= erste orientierende Anlagerung des Wirtstoffs an den Rezeptor), sondern auch für die endgültige Verankerung bei der Ausbildung des Arzneistoff-Rezeptor-Komplexes von exzeptioneller Bedeutung. Die Ladungsverteilung wird als Punktladung in den Kernen der beteiligten Atome approximiert.

Darüberhinaus ist die Kenntnis der Polarisierbarkeit der jeweiligen im Molekül auftretenden Bindungen erforderlich, welche als additive Größe die Molekülpolarisierbarkeit ergeben. Bindungspolarisierbarkeiten für die verschiedenen Bindungstypen sind experimentell bestimmt worden (DENBIGH, 1940; LE FEVRE, 1965).

Basierend auf der Kenntnis der Ladungsverteilung (= MONOPOLE) sowie der Bindungspolarisierbarkeiten der Ausgangsmoleküle läßt sich nun mit Hilfe des Rechenverfahrens der Monopol-Bindungspolarisierbarkeitsmethode die Gesamtwechselwirkungsenergie zwischen diesen Molekülen (gemessen in kcal/mol) kalkulieren. Die Gesamtwechselwirkungsenergie ergibt sich dabei als Summe aus einem elektrostatischen, einem Polarisations-, einem Dispersions- und einem Repulsionsanteil:

$$E_{ges.} = E_{el.} + E_{dis.} + E_{pol.} + E_{rep.} \qquad (2.51)$$

Der elektrostatische Beitrag ist dabei definiert als:

$$E_{el.} = \sum_{i=1}^{n_1} \sum_{j=1}^{n_2} \frac{q_i \times q_j}{r_{ij}} \qquad (2.52)$$

wobei die Summation sich über die n_1 Atome von Molekül 1 (z.B. Derivat einer Abwandlungsreihe) und die n_2 Atome von Molekül 2 (z.B. Modellrezeptormolekül) erstreckt. q_i und q_j stellen die Atomladungen und r_{ij} den interatomaren Abstand dar.

Der Dispersionsanteil ist gegeben durch:

$$E_{dis.} = -\frac{1}{4}\frac{I_1 I_2}{I_1+I_2}\sum_{i=1}^{b_1}\sum_{j=1}^{b_2}\frac{1}{r_{ij}^6}\Big[6\,\alpha_i^T\,\alpha_j^T + \alpha_i^T\delta_j\Big\{3(\bar{\alpha}_j^L\cdot\bar{r}_{ij})^2+1\Big\} + \alpha_j^T\delta_i\Big\{3(\bar{\alpha}_i^L\cdot\bar{r}_{ij})^2+1\Big\} + \delta_i\delta_j\Big\{3(\bar{\alpha}_i^L\cdot\bar{r}_{ij})(\bar{\alpha}_j^L\cdot\bar{r}_{ij}) - (\bar{\alpha}_i^L\cdot\bar{\alpha}_j^L)\Big\}^2\Big] \qquad (2.53)$$

Hierbei bedeuten im einzelnen:

I_1, I_2: molekulares Ionisationspotential

α_i^T, α_j^T: transversale Polarisierbarkeit der iten bzw. jten Bindung

α_i^L, α_j^L: longitudinale Polarisierbarkeit der iten bzw. jten Bindung

r_{ij}: Abstand zwischen der iten und jten Bindung

$\bar{\alpha}_i^L$, $\bar{\alpha}_j^L$: Einheitsvektor längs der iten bzw. jten Bindung

$\bar{r}_{ij}$: Einheitsvektor längs der Verbindungslinie der Mittelpunkte von der iten zur jten Bindung

δ: $\alpha^L - \alpha^T$

Diese Definitionsgleichung ist die exakte Ausführung der bekannten Näherungsgleichung für Dispersionskräfte:

$$E = -3\Delta\bar{\epsilon}\alpha^2/4d^6 \qquad (2.54)$$

wobei $\Delta\bar{\epsilon}$ eine durchschnittliche Anregungsenergie, α die mittlere Polarisierbarkeit jeder Gruppe sowie d den Gruppenabstand definieren. Dispersionskräfte (auch van der Waals- oder London Kräfte genannt) werden immer dann wirksam, wenn zwei beliebige Atome verschiedener Moleküle nahe genug zueinander

liegen. Ursache dieser Kräfte ist die Fluktuation von Elektronen in den Orbitalen aufgrund ihrer quantenmechanischen Zufallsbewegung, wie sie in der Heisenberg'schen Unschärferelation beschrieben ist. Die dadurch in den Atomen und Molekülen entstehenden oszillierenden Dipole induzieren Dipole in den Nachbarmolekülen, was wiederum zu Anziehungskräften zwischen den Molekülen führt. Definitionsgleichung (2.53) trägt der Tatsache Rechnung, daß für unsymmetrische Substituenten anstelle einer "mittleren Polarisierbarkeit" besser ein transversaler und ein longitudinaler Anteil zur exakten Beschreibung der Polarisierbarkeit angegeben werden.

Die Polarisationsenergie ist ein Maß für die Deformierung einer Bindungselektronenwolke, wie sie durch die Nähe eines geladenen Teilchens hervorgerufen wird:

$$E_{pol.}^{1\rightarrow 2} = -\frac{1}{2}\sum_{k=1}^{b_2}\left[\alpha_k^T(\bar{\epsilon}_k \cdot \bar{\epsilon}_k) + \delta_k(\bar{\epsilon}_k \cdot \bar{\alpha}_k^L)^2\right] \qquad (2.55)$$

Für $\bar{\epsilon}_k$ gilt:

$$\bar{\epsilon}_k = \sum_{\beta=1}^{n_1}\frac{q_\beta}{R_{\beta k}^3} \cdot \bar{R}_{\beta k} \qquad (2.56)$$

Die benutzten Terme haben die gleiche Bedeutung wie in Gleichung (2.53); darüberhinaus ist $\bar{R}_{\beta k}$ definiert als der Vektor, der das Atom ß mit dem Mittelpunkt der kten Bindung verbindet. $R_{\beta k}$ ist dann die entsprechende Größe dieses Vektors. Gleichung (2.55) definiert die Polarisation der Bindungen im Molekül 2, hervorgerufen durch die Netto-Atomladungen in Molekül 1. Eine entsprechende Gleichung existiert für den umgekehrten Fall und die Gesamtpolarisationsenergie ergibt sich dann aus:

$$E_{pol.} = E_{pol.}^{1\rightarrow 2} + E_{pol.}^{2\rightarrow 1} \qquad (2.57)$$

Der Repulsionsanteil in (2.51) ist ein Abstoßungsterm, der erst bei Abständen unter 4 Ångström Bedeutung erlangt. Er wird nach einer Gleichung berechnet, die aus Kristallgitterenergien von Kohlenwasserstoffen entwickelt wurde (KITAYGORODSKY, 1961):

$$E_{rep.} = 30000 \sum_{i=1}^{N_1} \sum_{j=1}^{N_2} e^{-5.5 r_{ij} (V_i V_j)^{1/2}} \qquad (2.58)$$

r_{ij} ist auch hier wieder der interatomare Abstand während V_i und V_j die entsprechenden van der Waals'schen Radien darstellen.

Voraussetzung für Wechselwirkungsenergieberechnungen dieser Art ist eine geeignete Geometrie des Wechselwirkungsmodells. Sie wird auf der Grundlage der erwähnten Konformationsanalysen anhand von Dreidingmodellen so ausgewählt, daß keine störenden sterischen Wechselwirkungen stattfinden können. Der Abstand zwischen den reagierenden Oberflächen wird im Rechenverfahren solange variiert, bis die Korrelation zwischen pharmakologischer Aktivität und Bindungsstärke optimal ist.

Abschließend sei nochmals erwähnt, daß dieses Modell die Vorgänge bei der Bildung von Wirkstoff-Rezeptorkomplexen nur angenähert wiedergibt. Positive Korrelationsergebnisse mit diesem Verfahren lassen daher lediglich den Schluß zu, daß der gewählte Modellrezeptor ähnliche chemische Eigenschaften wie die tatsächliche in-vivo Bindungsstelle besitzt.

2.5. DIE BESTIMMUNG VON R_M-WERTEN MIT DER PHASENUMKEHR-DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Die Lipophilie von Untersuchungssubstanzen läßt sich - wie in 2.3.2.3. bereits ausführlich beschrieben - sehr einfach mit Hilfe der Phasenumkehr-Dünnschichtchromatographie quantifizieren.

Bei den vorliegenden Untersuchungen repräsentieren silanisierte Silica gel Dünnschichtplatten mit einem inkorporiertenten Fluoreszenzindikator (TLC Silica gel 60 F_{254}, MERCK) die stationäre nicht-polare Phase. Als mobile polare Phase dienten für die verschiedenen Arzneistoffgruppen unterschiedliche organisch-wässrige Gemische folgender Zusammensetzung:

Ca-Antagonisten u. strukturverwandte Pharmaka		Verapamilderivate Gruppe I		Verapamilderivate Gruppe II	
Aceton	50	Methanol	70	Methanol	80
H_2O	48	H_2O	28	H_2O	18
Ammoniumacetat (0.2 M; pH 7.4)	2	Ammoniumacetat (0.2 M; pH 7.4)	2	Ammoniumacetat (0.2 M; pH 7.4)	2

Die Zusammensetzung der Gemische wurde nach der Methode von BOYCE und MILBORROW (1965) ermittelt. Alle Testsubstanzen wurden in Form der freien Basen eingesetzt. Sie wurden durch Ausschütteln der entsprechenden Salze mit einem Gemisch aus Essigsäureethylester und 1 N NaOH (Verhältnis 1:1) hergestellt. 2-3 µl der in der organischen Phase gelösten Basen wurden mittels Mikropipetten als kreisrunde Tropfen auf der Startlinie aufgetragen. Die Startlinie hatte einen Abstand von 2 cm vom unteren Plattenrand. Der Abstand zwischen den einzelnen Arzneistoffproben betrug ebenfalls 2 cm.

Nach dem Trocknen der Probenflecken wurden die Substanzen in der vorgesättigten Kammer bei konstanter Temperatur (23°C ± 0.5°C) über eine Laufstrecke von 12 cm entwickelt.

Nach dem Trocknen der Platten konnten die Probenflecken unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm analysiert werden.
Die experimentell bestimmten R_f-Werte stellen die Mittelwerte aus 3 Bestimmungen dar.

Nach BATE und WESTALL lassen sich aus den R_f-Werten die entsprechenden R_M-Werte ermitteln:

$$R_M = \log (1/R_f - 1) \qquad (2.36)$$

2.6. DIE pK_a-WERTBESTIMMUNG DURCH POTENTIOMETRISCHE MIKROTITRATION

Die meisten Arzneistoffe sind schwache Basen oder Säuren, die in wässrigen Lösungen nicht vollständig dissoziieren. Das Konzentrationsverhältnis von dissoziiertem und nichtdissoziiertem Anteil wird durch die Dissoziationskonstante K_a beschrieben. Für den in dieser Arbeit interessierenden Fall schwacher Stickstoffbasen gilt:

$$K_a = \frac{[H^+][\text{nicht protonierte Base}]}{[\text{protonierte Base}]} \qquad (2.59)$$

In der logarithmierten Form ergibt sich daraus die bekannte Henderson-Hasselbalch-Gleichung:

$$pK_a = pH + \log \frac{[\text{protonierte Base}]}{[\text{nicht protonierte Base}]} \qquad (2.60)$$

Anhand der so ermittelten pK-Werte läßt sich die Basenstärke z.B. einer Stickstoffbase abschätzen; sie ist umso größer, je höher der betreffende pK-Wert.

Aus Gleichung (2.60) läßt sich der ionisierte Anteil eines Arzneistoffs für einen gegebenen pH ermitteln:

$$\alpha = \frac{1}{10^{pH-pK} + 1} \qquad (2.61)$$

In Prozenten der Gesamtkonzentration berechnet man den ionisierten Anteil nach der Formel:

$$\text{ionisierter Anteil } (\%) = \frac{100}{1 + \text{antilog } (pH-pK_a)} \qquad (2.62)$$

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ionisationskonstanten der Untersuchungssubstanzen mittels potentiometrischer Mikrotitration bestimmt. Aufgrund der schlechten Löslichkeit und der geringen Mengen verfügbarer Substanzen wurde als Lösungsmittel eine Ethanol-Wasser Mischung und als Teststoffkonzentration 0.6 mM gewählt.

Den Versuchsaufbau zur pK_a-Messung durch potentiometrische Mikrotitration gibt nachstehende Abbildung wieder.

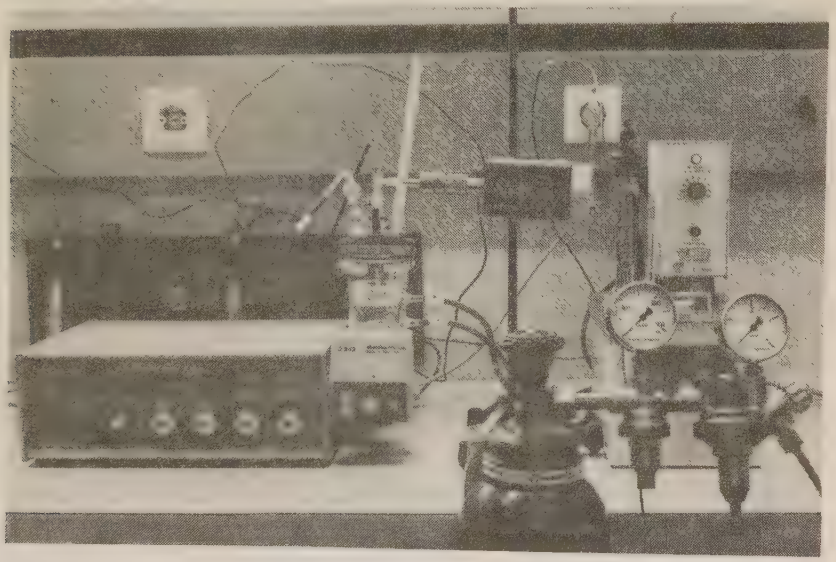


Abb. 7

Als Titrationsgefäß diente ein doppelwandiges 20 ml-Becherglas, das durch rezirkulierendes Wasser auf einer konstanten Meßtemperatur von 25°C (± 0.1°C) gehalten wurde. Es wurden eine pH-Glaselektrode in Verbindung mit einem pH-Meter (Metrohm E 580) und eine Mikrobürette (Metrohm E 457) verwendet. Eine an der Mikrobürette angebrachte Mikrospitze erlaubte die exakte Zugabe kleiner Mengen Titrationsflüssigkeit. Die Mikrospitze wurde nur während der Flüssigkeitszugabe in die Probenlösung getaucht; auf diese Weise konnten diffusionsbedingte Meßfehler während der pH-Messung vermieden werden. Da die Untersuchungssubstanzen ausnahmslos oxidationsempfindliche Stickstoffbasen waren, wurden die Messungen zur Verhinderung einer CO_2-Adsorption aus der Luft unter einer Argonatmosphäre über der Probenlösung durchgeführt. Ein geschwindigkeitskonstanter Magnetrührer erlaubte homogenes Rühren der Probenlösung.

Meßverfahren: Es wurden Standardpuffer von RIEDEL-de HAEN zur Eichung der pH-Glaselektrode bis zur 3. Dezimale benutzt. Als Probenlösung dienten 20 ml eines Ethanol-Wasser Gemisches (40 : 60), das 10 mM an HCl, 5 mM an KCl und 0.6 mM[+)] an Arzneistoff war. Als Titrationsflüssigkeit wurde eine 0.5 N ethanolische KOH (40%) verwendet. Auf die gleiche Art und Weise wurde in Abwesenheit von Arzneistoff eine Blindtitration durchgeführt. Die graphische Auswertung der Bestimmung erfolgte durch Auftragung des Titrantenverbrauchs gegen den gemessenen pH. Durch Subtraktion der beiden Titrationskurven ergab sich eine Differenzkurve, aus deren Wendepunkt der pK-Wert ermittelt werden konnte. Die unter 3.5. wiedergegebenen Ergebnisse dieser Bestimmungen stellen die Mittelwerte aus drei Messungen und deren Streuung dar.

[+)] Für pK-Bestimmungen unter 7 wurden die gleichen Bedingungen gewählt wie oben beschrieben; die Arzneistoffkonzentration betrug in diesen Fällen jedoch 10 mM.

7. DIE MESSUNG DER SUBSTITUENTENPOLARISIERBARKEIT

Unter den elektronischen Eigenschaften zur physikalisch-chemischen Charakterisierung von Substituenten spielt die Substituentenpolarisierbarkeit eine entscheidende Rolle. Signifikante Korrelationen dieses Parameters mit der biologischen Wirksamkeit von Untersuchungssubstanzen werden als induzierte Dipol-Dipolinteraktionen zwischen Arzneistoffen und ihren Rezeptoren interpretiert (siehe z.B. GILL, 1965).

Experimentell läßt sich die Polarisierbarkeit nach zwei verschiedenen Ansätzen ermitteln: entweder anhand der Beziehung zwischen Dielektrizitätskonstante (ϵ) und Polarisierbarkeit (CLAUSIUS-MOSOTTI Gleichung) oder wie in der vorliegenden Arbeit anhand der Beziehung zwischen Brechungsindex (n) und Polarisierbarkeit, die mit der LORENZ-LORENTZ Gleichung beschrieben wird:

$$MR = \frac{n^2-1}{n^2+2} \cdot \frac{M}{d} = \frac{4}{3}\pi \cdot N_L \cdot \bar{\alpha}' \qquad (2.63)$$

MR : Molekularrefraktion
$\bar{\alpha}'$: optische Polarisierbarkeit
N_L : Loschmidt-Zahl
M : Molekulargewicht
d : Dichte

Durch Umformen ergibt sich für die Berechnung der Polarisierbarkeit aus Brechungsindices die Gleichung:

$$\bar{\alpha}' = \frac{3(n^2-1) \cdot M}{4\pi(n^2+2) \cdot d \cdot N_L} \qquad (2.64)$$

Die Bestimmung der Brechungsindices wurde mit Hilfe eines He-Ne-Lasers mit der Wellenlänge 632.8 nm unter Ausnutzung des Snellius'schen Brechungsgesetzes bestimmt (Abb. 8). Die Meßzelle war aus Teflon gefertigt, um Wechselwirkungen zwischen Zellenmaterial und Untersuchungssubstanz zu vermeiden. Die Zelle war so konstruiert, daß ein Glasfenster zum einfallenden

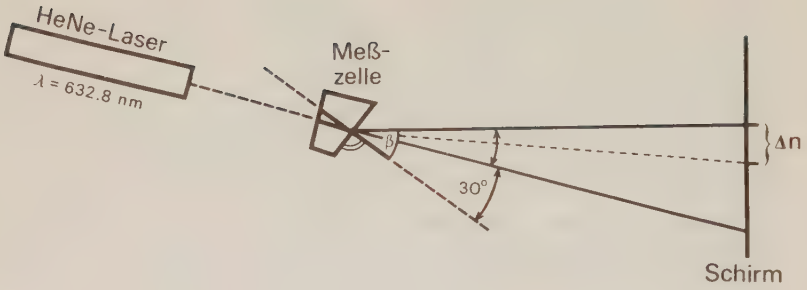


Abb. 8: Schema der Meßanordnung zur Bestimmung von Brechungsindices.

Laserstrahl senkrecht orientiert und das Austrittsfenster um 30° zum Laserstrahl geneigt war. Die Ablenkung des Laserstrahls wurde in einem Abstand von 15 m auf einem Schirm gemessen. Die Ablesegenauigkeit des auftreffenden Laserstrahls betrug $\pm$ 1 mm; dies entspricht einer Auflösung für Δn von 7×10^{-5}.

In der vorliegenden Arbeit interessierten insbesondere Polarisierbarkeitsdaten für die Ringsubstituenten des Aromaten am asymmetrischen Kohlenstoff im Verapamilmolekül. Da das Restmolekül für alle Verbindungen dieser Reihe identisch ist, wurden bei den Messungen anstelle der Verapamilderivate die entsprechend substituierten Benzolderivate eingesetzt (Strukturformeln siehe 7.5.). Die Untersuchungssubstanzen waren mit Ausnahme von 1,2,3-Trimethoxybenzol Flüssigkeiten. Für Trimethoxybenzol wurde eine Verdünnungsreihe in Benzol mit den Konzentrationen 5, 10, 20 und 30 g auf 50 ml angesetzt. Die Messungen wurden bei einer konstanten Versuchstemperatur von 20°C durchgeführt.

8. DIE BESTIMMUNG DES MOLEKULAREN DIPOLMOMENTS

Die Messungen zur Bestimmung des molekularen Dipolmoments von Benzolderivaten mit analogem Substitutionsmuster zu ringsubstituierten Verapamilderivaten wurden mit einem Dipolmeter DM 01 der Firma WTW durchgeführt (siehe Abb. 9)[+].
Das Gerät arbeitet nach der Schwebungsmethode, bei der die Schwingungen zweier hochfrequenter Oszillatoren in einem Mischteil zur Überlagerung gebracht werden. Die entstehenden Schwebungen werden verstärkt und auf dem Leuchtschirm einer Braun'schen Röhre angezeigt. Die Meßzelle mit dem zu messenden Dielektrikum sind Teile des einen Schwingungserzeugers. Die Summe beider Kapazitätswerte wird durch Veränderung eines Meßdrehkondensators so eingestellt, daß dieselbe Frequenz entsteht wie beim andern Schwingungserzeuger (Schwebungsnull). Die Meßwerte können bis zur 5. Dezimale genau abgelesen werden.

Das Meßprinzip beruht auf der Bestimmung der Orientierungspolarisation, die üblicherweise als Differenz aus Molpolarisation und Molrefraktion ermittelt wird. Dazu wird bei konstanter Temperatur (20.0°C) die Konzentrationsabhängigkeit der Molpolarisation mit Hilfe der Dielektrizitätskonstantenmessung verdünnter Lösungen bestimmt und auf unendliche Verdünnung extrapoliert. Die Molrefraktion erhält man aus Bestimmungen des Brechungsindex.
Für die Bestimmung der Dielektrizitätskonstanten (DK) wurden Verdünnungsreihen der Benzolderivate in Tetrachlorkohlenstoff hergestellt. Tetrachlorkohlenstoff erfüllt die Bedingungen eines indifferenten unpolaren Lösungsmittels und ist daher besonders gut für die Durchführung von DK-Messungen geeignet.

Vor Beginn dieser Messungen wurde anhand von Eichflüssigkeiten bekannter DK (Cyclohexan: 2.0228; Tetrachlorkohlenstoff: 2.2326; Benzol: 2.2825) eine Eichgerade erstellt, mit deren

---

[+] Ich möchte an dieser Stelle der Firma WTW danken, die uns für diese Messungen ein Leihgerät zur Verfügung gestellt hat.

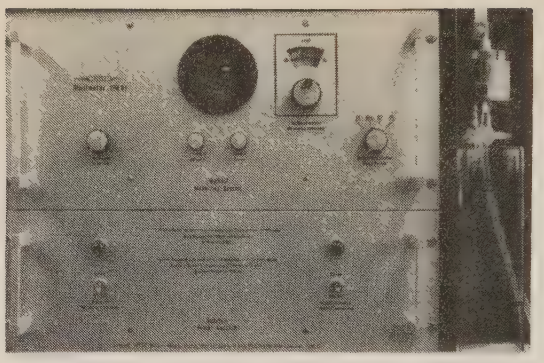


Abb. 9: Dipolmeter DM 01 (WTW, Weilheim).

Hilfe zu jeder Skalenablesung die zugehörige Dielektrizitätskonstante ermittelt werden kann.
Die Messungen des Brechungsindex wurden anhand des unter 2.7. beschriebenen Verfahrens mit Hilfe eines He-Ne Lasers durchgeführt. Die Bestimmungsgleichung zur Berechnung des Dipolmoments lehnt sich an das Auswertverfahren von HEDESTRAND an und hat die Form:

$$\mu = \sqrt{\frac{27\,kT}{4\pi N_L} \cdot \frac{1}{d_1(\epsilon_1+2)^2} \cdot (a_\epsilon - a_n) \cdot M_2} \qquad (2.65)$$

Dabei bedeuten im einzelnen:
k = Boltzmann-Konstante
T = absolute Temperatur
N_L = Loschmidt'sche Zahl
d_1 = Dichte des Lösungsmittels ($C Cl_4$)
ϵ_1 = Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels
a_ϵ = Steigung der Geraden $(\epsilon_{12} - \epsilon_1) = f(W_2)$
a_n = Steigung der Geraden $(n_{12}^2 - n_1^2) = f'(W_2)$

$(\epsilon_{12} - \epsilon_1)$ beschreibt die Differenz der Dielektrizitätskonstanten von gelöster Substanz und Lösungsmittel, während $(n_{12}^2 - n_1^2)$ die analoge Beziehung für die Brechungsindices wiedergibt. W_2 ist als Massengehalt definiert und stellt den Quotienten aus der Einwaage an Untersuchungssubstanz (m_2) und dem Gesamtgewicht von Lösungsmittelmenge plus Einwaage ($m_1 + m_2$) dar.

E R G E B N I S S E

. DIE NEGATIV INOTROPE HERZWIRKUNG

.1. Die Wirkung der razemischen Verbindungen

Zum Verständnis einer Analyse des inotropen Wirkmusters am Herzmuskel ist eine Darstellung all der Prozesse notwendig, die die Erregungsvorgänge mit der Kontraktion verknüpfen und die in der Gesamtheit als elektromechanische Koppelung (EMK) bezeichnet werden. Eine zusammenfassende Darstellung gibt Kapitel 1.2. Die dort beschriebenen Modellvorstellungen sind in der Lage, das kontraktile Verhalten des Herzmuskels unter verschiedenen experimentellen Bedingungen (Frequenzwechsel, Pausenverhalten, Änderung der extrazellulären Kalziumkonzentration usw.) richtig vorauszusagen. Sie können daher auch zur Analyse arzneistoffbedingter Veränderungen im kontraktilen Verhalten des Herzmuskels herangezogen werden, soweit diese Stoffe in die Prozesse der EMK eingreifen. Dazu bedarf es eines festgelegten Programms von Versuchsbedingungen, das folgende Einzeluntersuchungen umfaßt (jeweils unter Kontrollbedingungen und Substanzeinfluß): Bestimmung der Amplituden-Frequenzbeziehung im Gleichgewicht, Erfassung transitorischer Treppenphänomene nach Frequenzwechsel und Darstellung des Amplituden-Pausenverhaltens. Anhand des Modells können sodann aus der Gesamtheit der Ergebnisse Schlüsse gezogen werden, welche speziellen Prozesse der EMK von den fraglichen Substanzen beeinflußt werden.
Die Untersuchungssubstanzen umfaßten die sechs Kalziumantagonisten Verapamil, Prenylamin, Fendilin, Bencyclan, Tiapamil und Bepridil sowie die vier strukturverwandten Pharmaka Mebeverin, Dilazep, Hexobendin und Aprindin.
Wichtige Merkmale inotroper Wirkmuster erhält man aus der Amplituden-Frequenzbeziehung im Gleichgewicht (sog. stationäre Amplituden-Frequenzbeziehung) bzw. aus den bei Frequenzwechsel zu beobachtenden transitorischen Phänomenen. Abb.10 zeigt Originalregistrierungen, die zur Bestimmung

Abb.10 Originalregistrierung isotoner Kontraktionen eines isolierten Katzenpapillarmuskels bei den Reizfrequenzen 6, 12, 30 und 60/min unter Kontrollbedingungen. Erhöht man bei einem rhythmisch gereizten Papillarmuskel stufenweise die Reizfrequenz zwischen 6 und 60/min, so reagiert der Muskel üblicherweise mit einem treppenförmigen Ansteigen der Kontraktionsamplituden bis zu einem neuen, höheren steady state. Bei höheren Frequenzen geht der positiven Treppe von 10-15 Schlägen eine kurze (1-2 Schläge) negative Treppe voraus.

derartiger Amplituden-Frequenzbeziehungen aufgenommen wurden. Wie aus dem Beispiel der Kontrollregistrierung deutlich wird, reagiert der rhythmisch gereizte Papillarmuskel bei plötzlicher Erhöhung der Reizfrequenzen zwischen 6 und 60/min charakteristischerweise immer mit einem treppenförmigen Ansteigen der Kontraktionsamplituden, die nach wenigen Schlägen einen neuen, höheren Gleichgewichtswert erreichen. Bei höheren Frequenzen geht der positiven Treppe von 10 bis 15 Schlägen eine sehr kurze (1 - 2 Schläge) negative Treppe voraus (MEIJLER, 1962; KOCH-WESER und BLINKS, 1963).
Bei den hier dargestellten Versuchen wird die Reizung auf der Frequenzstufe 6 für 8 min und auf den weiteren Frequenzstufen für 4 min fortgesetzt. Der am Ende jeder Frequenzstufe erreichte Amplitudenwert wird zur Bestimmung der stationären Amplituden-Frequenzbeziehung bzw. der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung herangezogen.
Die Abbildungen 11 und 12 zeigen Originalregistrierungen zur Bestimmung von stationären Amplituden-Frequenzbeziehungen unter Einwirkung der oben genannten Untersuchungssubstanzen.

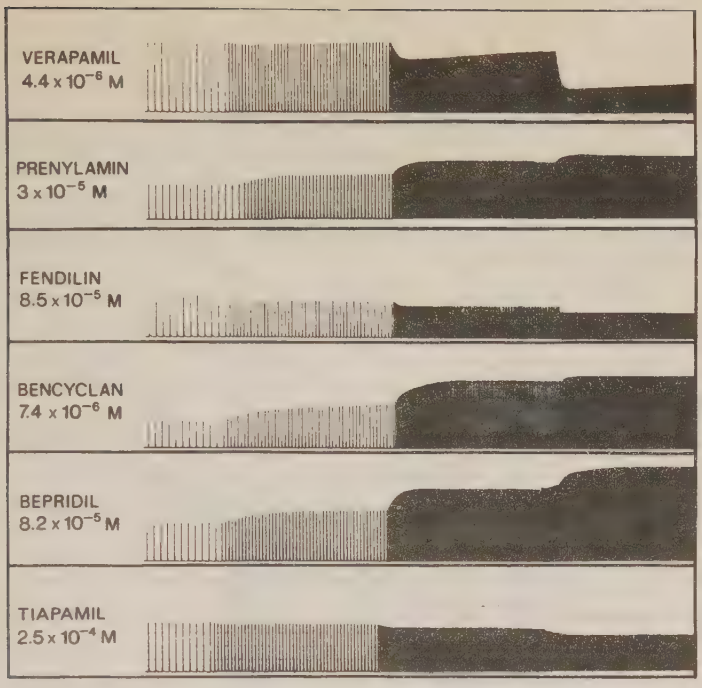


Abb.11: Originalregistrierungen isoton kontrahierender Katzenpapillarmuskeln unter der Einwirkung von Kalziumantagonisten (MANNHOLD et al., 1980).

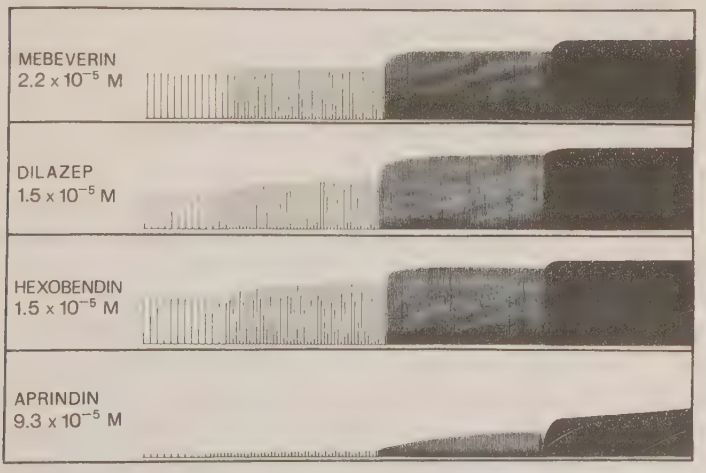


Abb.12: Originalregistrierungen isoton kontrahierender Katzenpapillarmuskeln unter der Einwirkung strukturverwandter herzwirksamer Pharmaka (MANNHOLD et al., 1980).

Anhand ihrer Beeinflussung der stationären Amplituden-Frequenzbeziehung kann man die Kalziumantagonisten und verwandte negativ inotrope Pharmaka in drei Gruppen mit qualitativ unterschiedlichen Wirkungen einteilen:

I) Substanzen, die bevorzugt bei hohen Reizfrequenzen wirken (Umkehr der AFB):
Verapamil, Fendilin, Tiapamil.

II) Substanzen, die frequenzunabhängig wirken (Parallelverschiebung der AFB):
Prenylamin.

III) Substanzen, die bevorzugt bei niedrigen Reizfrequenzen wirken (Betonung der AFB):
Bencyclan, Bepridil, Mebeverin, Dilazep, Hexobendin, Aprindin.

Trotz dieser formalen Einteilung wird deutlich, daß die qualitative Wirkung der Verbindungen innerhalb der einzelnen Gruppen nicht völlig identisch ist. Betrachtet man zum Beispiel in der ersten Gruppe die transitorischen Phänomene nach plötzlichem Frequenzwechsel zu höheren Reizfrequenzen, so findet man bei Verapamil eine schnelle Abnahme der Kontraktionsamplituden und einen darauffolgenden langsamen Wiederanstieg zu einem neuen, niedrigeren Gleichgewichtswert (biphasische Treppen). Unter Einwirkung von Tiapamil und Fendilin sind dagegen nur monophasische Übergänge zu beobachten. Nach einer kurz dauernden negativen Treppe wird direkt der neue Gleichgewichtswert erreicht.
Mit Ausnahme von Aprindin lassen die Verbindungen der Gruppen II und III die transitorischen Treppenphänomene nach Frequenzwechsel nahezu unbeeinflußt. Unter Aprindin kommt es zu langanhaltenden transitorischen Treppen (bis zu 240 Schläge), ähnlich wie dies unter Diphenylhydantoin von BAYER et al. (1977) beobachtet worden ist. Die entsprechenden aus den Amplituden-Frequenzbeziehungen abgeleiteten Konzentrations-Wirkungskurven für die niedrigste (6/min) und die höchste (60/min) benutzte Reizfrequenz sind in den Abbildungen 13 und 14 dargestellt, die daraus abgeleiteten ED_{50}-Werte in Tabelle 6.

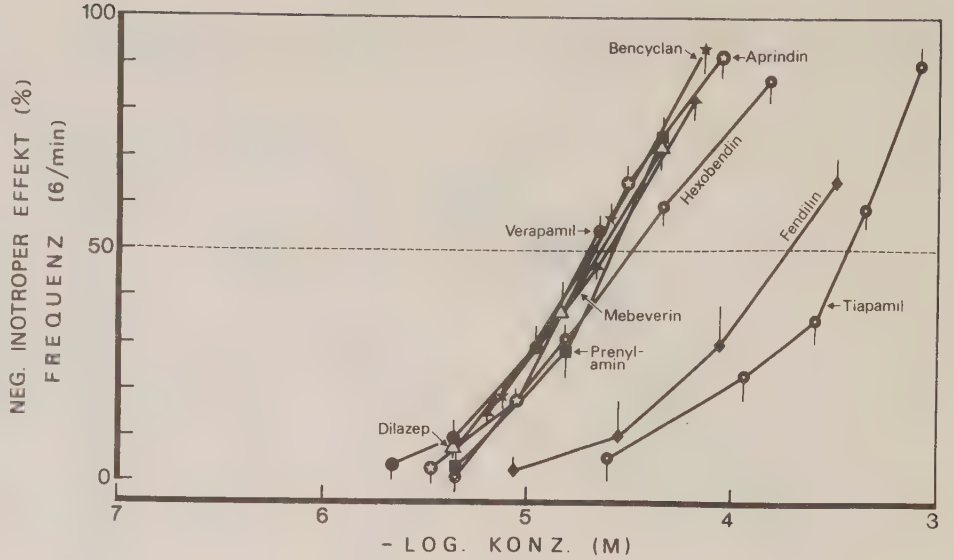


Abb. 13: Konzentrations-Wirkungskurven für den negativ inotropen Effekt der Untersuchungssubstanzen bei der Reizfrequenz 6/min (MANNHOLD et al., 1980).

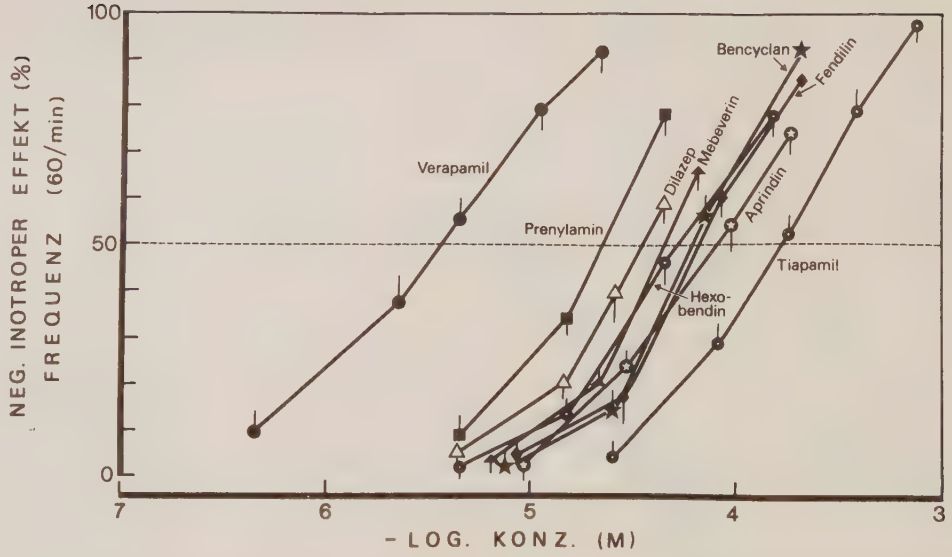


Abb. 14: Konzentrations-Wirkungskurven für den negativ inotropen Effekt der Untersuchungssubstanzen bei der Reizfrequenz 60/min (MANNHOLD et al., 1980).

Substanz	Reizfrequenz 6/min ED_{50} (M)	Reizfrequenz 60/min ED_{50} (M)
Verapamil	1.9(1.8 - 2.1) x 10^{-5}	3.5(3.0 - 4.1) x 10^{-6}
Prenylamin	2.5(2.3 - 3.0) x 10^{-5}	2.0(1.8 - 2.6) x 10^{-5}
Fendilin	8.8(8.2 - 9.1) x 10^{-5}	5.0(4.5 - 5.8) x 10^{-5}
Bencyclan	2.0(1.7 - 2.3) x 10^{-5}	6.4(5.8 - 7.2) x 10^{-5}
Tiapamil	5.2(4.6 - 5.4) x 10^{-4}	1.7(1.5 - 2.0) x 10^{-4}
Mebeverin	2.4(2.0 - 2.8) x 10^{-5}	4.9(4.7 - 5.6) x 10^{-5}
Dilazep	2.3(1.9 - 2.7) x 10^{-5}	3.5(3.1 - 4.0) x 10^{-5}
Hexobendin	3.2(2.8 - 3.6) x 10^{-5}	5.1(4.5 - 5.4) x 10^{-5}
Aprindin	2.3(2.1 - 2.5) x 10^{-5}	8.0(7.0 - 9.2) x 10^{-5}

Tab. 6: ED_{50}-Werte für den negativ inotropen Effekt der Untersuchungssubstanzen bei den Reizfrequenzen 6 und 60/min.

Wie aus den ED_{50}-Werten hervorgeht, sind für die jeweiligen Reizfrequenzen z.T. erhebliche Wirksamkeitsunterschiede festzustellen. Zur Quantifizierung dieser Frequenzabhängigkeit der negativ inotropen Wirkung ist in Tab. 7 der Quotient ED_{50} (6/min)/ED_{50}(60/min) wiedergegeben.

Substanz	Frequenzquotient
Verapamil	5.43(5.12 - 6.0)
Tiapamil	3.06(2.70 - 3.07)
Fendilin	1.76(1.57 - 1.82)
Prenylamin	1.25(1.15 - 1.28)
Dilazep	0.66(0.61 - 0.68)
Hexobendin	0.63(0.62 - 0.67)
Mebeverin	0.49(0.43 - 0.50)
Bencyclan	0.31(0.29 - 0.32)
Aprindin	0.29(0.27 - 0.30)

Tab. 7: Frequenzquotienten zur Quantifizierung der Frequenzspezifität der negativ inotropen Wirkung. Die Quotienten sind umso größer, je ausgeprägter eine Untersuchungssubstanz bei hohen Reizfrequenzen wirkt und umso niedriger, je ausgeprägter eine Verbindung bei niedrigen Reizfrequenzen wirkt.

Durch den Vergleich der Effekte von Ni^{2+}, La^{3+} und Ca^{2+}-Entzug auf die AFB und die transitorischen Treppenphänomene schlossen BAYER et al. (1975a) sowie MANNHOLD (1977), daß die Wirkung von Verapamil nicht allein durch eine Hemmung des transmembranären Ca^{2+}-Einwärtsstroms erklärbar ist. Eine frequenzabhängige Verlangsamung der Wiederverfügbarkeit des vom SR zurückgebundenen Kalziums wurde als zusätzlicher Wirkmechanismus für die frequenzspezifisch negativ inotrope Wirkung von Verapamil gefordert.

Die Kinetik der Wiederverfügbarkeit von intrazellulärem Speicherkalzium läßt sich experimentell dadurch prüfen, daß nach einer rhythmischen Reizung des Herzmuskels eine Reizpause verschiedener Länge eingeschaltet und danach eine Testkontraktion ausgelöst wird. Die Amplituden dieser Testkontraktionen, gegen die Pausenlänge aufgetragen, ergeben eine charakteristische Amplituden-Pausenbeziehung, die in etwa die Wiederverfügbarkeit (Restitutionskinetik) des intrazellulär gespeicherten kontraktionswirksamen Kalziums wiederspiegelt (HOMBURGER und Mitarbeiter, 1973). Unter Kontrollbedingungen verläuft dieser Restitutionsprozeß in seinem Anfangsteil nahezu exponentiell mit einer Zeitkonstanten von 300-400 ms und erreicht nach 2 s ein meist überschießendes Plateau, um dann wieder langsam abzufallen. Dementsprechend sind die Amplituden von Testkontraktionen - ausgelöst nach Reizpausen von 2, 4 und 8 s - unter Kontrollbedingungen nahezu gleich groß und gegenüber den Kontraktionen der Vorreizung leicht erhöht.

Völlig verändert ist jedoch das Bild unter der Einwirkung von Verapamil: 4.4×10^{-5} M bzw. 1.1×10^{-5} M verlängern die Zeitkonstanten der Restitutionsprozesse von 300 ms auf mehr als 3 bzw. 5 s (Abb. 15) und die Amplituden der Testkontraktionen nehmen noch nach Reizpausen von 2, 4 und 8 s weiter zu. Besonders auffällig ist dabei, daß die Amplituden dieser Testkontraktionen die Amplituden der frequenten Vorreizung um ein Vielfaches übertreffen.

Die entsprechenden Experimente wurden auch für die beiden anderen, insbesondere bei hohen Reizfrequenzen wirkenden Kalziumantagonisten Tiapamil und Fendilin, durchgeführt. Die Ergebnisse mit Tiapamil zeigt die Abb. 16.

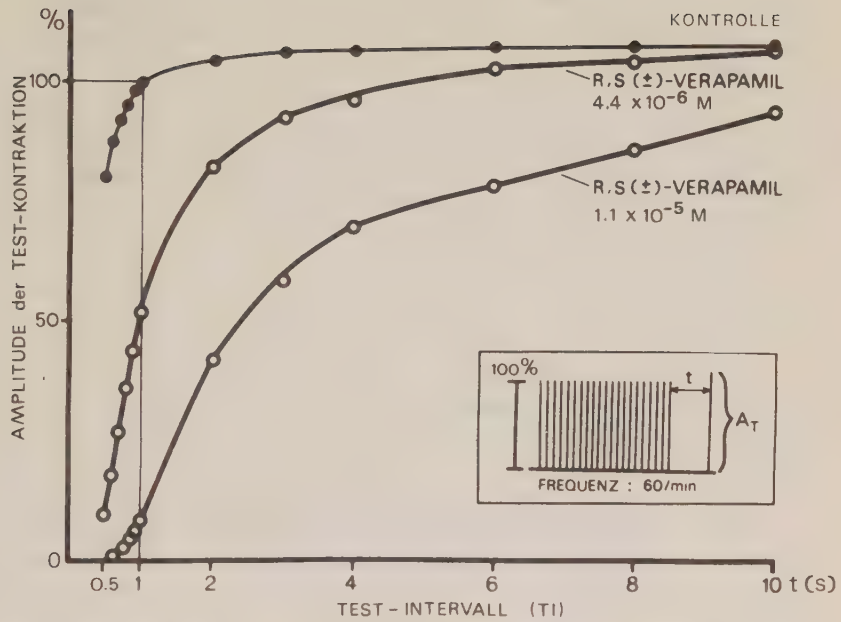


Abb. 15: Amplituden-Pausenbeziehungen (Restitutionskinetik der intrazellulären Kalziumverfügbarkeit) unter Verapamileinwirkung im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Die rhythmische Vorreizung (60/min) wird jeweils nach Erreichen des steady state unterbrochen und dann nach unterschiedlich langen Pausen (0.5 - 10 s) eine Testkontraktion ausgelöst. Die Amplituden der Testkontraktionen (A_T) werden auf die Höhe der steady state Amplitude während der Vorreizung (= 100%) bezogen. Die X-Achse bezeichnet die Dauer des Intervalls (TI) zwischen dem letzten regulären Schlag und dem Testreiz. Unter Kontrollbedingungen verlaufen die Amplituden-Pausenbeziehungen in ihrem Anfangsteil nahezu exponentiell mit einer Zeitkonstanten von 300-400 ms und erreichen nach 2 s ein meist überschießendes Plateau, um dann wieder leicht abzufallen. Dagegen werden unter 4.4×10^{-6} M bzw. 1.1×10^{-5} M Verapamil die Zeitkonstanten von 300 ms auf mehr als 3 - 5 s verlängert (BAYER et al., 1975a; MANNHOLD, 1977).

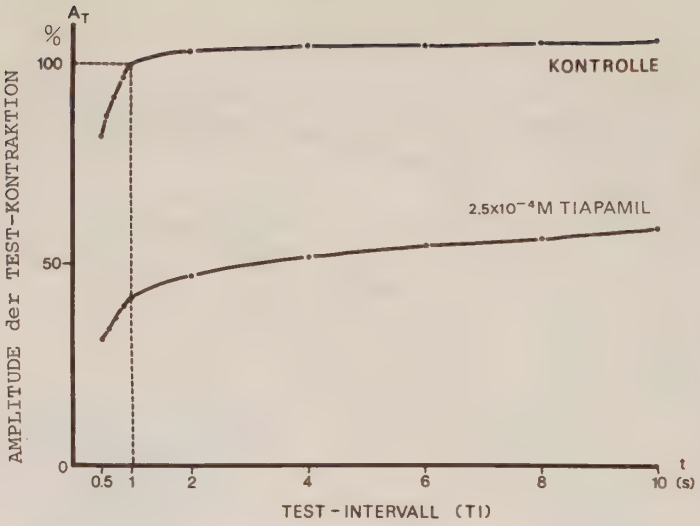


Abb.16 : Amplituden-Pausenbeziehung für einzelne Testkontraktionen des Katzenpapillarmuskels unter Tiapamileinwirkung im Vergleich zu Kontrollbedingungen.

Aus diesen Experimenten wird ersichtlich, daß Tiapamil den Restitutionsprozess ebenfalls leicht verlangsamt. Die Zeitkonstante wird von 0.4 (Kontrollbedingungen) auf 0.8 Sekunden unter Einfluß von 2.5×10^{-4} M Tiapamil erhöht. Neben diesen quantitativen Unterschieden zu Verapamil ergeben sich unter der Wirkung von Tiapamil auch qualitative Unterschiede. Trotz des verzögerten Restitutionsprozesses erreicht die Amplitude der Testkontraktion (AT) unter der Wirkung von Verapamil wieder den Kontrollwert (BAYER et al.,1975a). Im Gegensatz dazu reduziert Tiapamil (2.5×10^{-4} M) auch die Höhe der Kontraktionen, die nach Pausen von 10 Sekunden ausgelöst werden. Damit muß angenommen werden, daß unter Tiapamil nicht nur der Restitutionsprozeß etwas langsamer abläuft, sondern auch der maximale Füllungszustand der

intrazellulären Kalziumspeicher des SR vermindert ist. Im Gegensatz zu Verapamil und Tiapamil ließ sich im Falle des Fendilin (5.7×10^{-5} M) eine Verlangsamung des Restitutionsprozesses nicht nachweisen, obwohl es bei einem Frequenzquotienten von 1.76 (siehe Tab. 7) eine zwar schwache frequenzabhängig negativ inotrope Wirkung hat. Als generelle Regel kann gelten, daß die Verlangsamung der Restitutionskinetik umso stärker ist, je höher der Frequenzquotient für die negativ inotrope Wirkung ist.

3.1.2. Die Wirkung der Enantiomere

Schon seit langer Zeit weiß man bei einer Vielzahl razemischer Pharmaka von Wirkunterschieden ihrer jeweiligen Enantiomere (BECKETT, 1959; PATIL et al., 1975; PORTOGHESE, 1970). Dabei bezeichnet man die Pharmakonwirkung als stereospezifisch, wenn nur ein Enantiomer wirksam ist. Stereoselektivität dagegen bedeutet signifikante Wirksamkeitsunterschiede der Enantiomere bei qualitativ gleichartiger Wirkung. Wirksamkeitsunterschiede zwischen den Enantiomeren razemischer Pharmaka in einfachen in-vitro Testsystemen sind eines der stärksten experimentellen Indizien für die strukturspezifische, d.h. rezeptorvermittelte Wirkung eines Arzneistoffs.

Es lag daher nahe, zu untersuchen, ob und in welchem Umfang am isolierten Myokardpräparat Wirkunterschiede für die Enantiomere razemischer Untersuchungssubstanzen zu beobachten sind.

In der vorliegenden Arbeit konnten die inotropen Effekte der Fendilin- bzw. Prenylaminisomere mit den Eigenschaften der bereits früher untersuchten Verapamilenantiomere verglichen werden (BAYER et al., 1975b; MANNHOLD, 1977). Abb. 17 macht deutlich, daß die negativ inotrope Wirkung des linksdrehenden Verapamil der des Razemats ähnelt: die stationäre Amplituden-Frequenzbeziehung wird umgekehrt und die dynamischen Übergänge nach Frequenzwechsel werden verlangsamt. Im Gegensatz dazu läßt das rechtsdrehende Verapamil die biphasischen Treppen nach Frequenzwechsel unbeeinflußt und kehrt die AFB nicht um. Über diese qualitativen Unterschiede hinaus wirkt das rechtsdrehende Isomer erheblich schwächer negativ inotrop als das (-)-Enantiomer. Die entsprechenden Konzentrations-Wirkungskurven sind in Abb. 18 dargestellt. Auch hieraus erkennt man die ausgeprägte Stereoselektivität der negativ inotropen Verapamilwirkung.

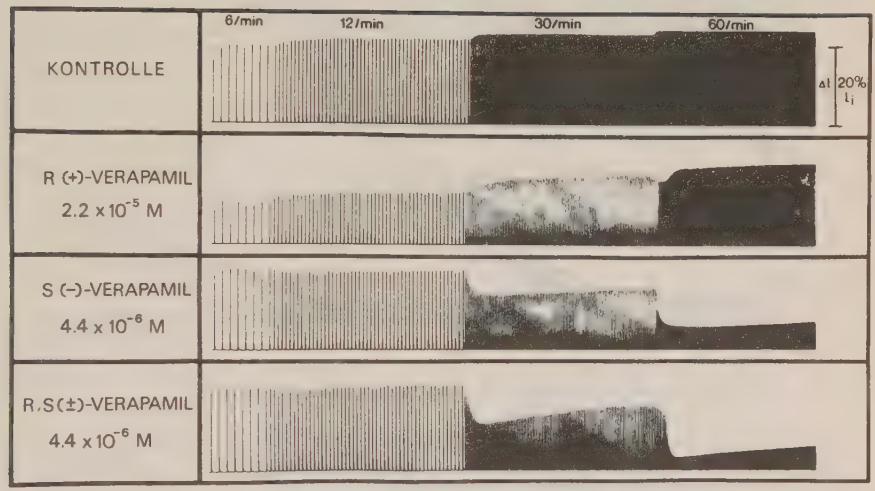


Abb. 17: Originalregistrierungen zur Ermittlung der Amplituden-Frequenzbeziehung unter razemischem Verapamil und seinen Enantiomeren im Vergleich zu Kontrollbedingungen. Man erkennt deutlich, daß die Wirkung des linksdrehenden Verapamils der des Razemats nahekommt: Die Amplituden-Frequenzbeziehung im steady state wird umgekehrt und die dynamischen Übergänge (biphasische Treppen) nach Frequenzwechsel werden verlangsamt.
Im Gegensatz dazu läßt R(+)-Verapamil die biphasischen Treppen nach Frequenzwechsel unbeeinflußt. Nur bei höheren Dosierungen ist bei Frequenzwechsel von 30/min auf 60/min eine kurz dauernde negative Treppe zu beobachten (BAYER et al., 1975b; MANNHOLD, 1977).

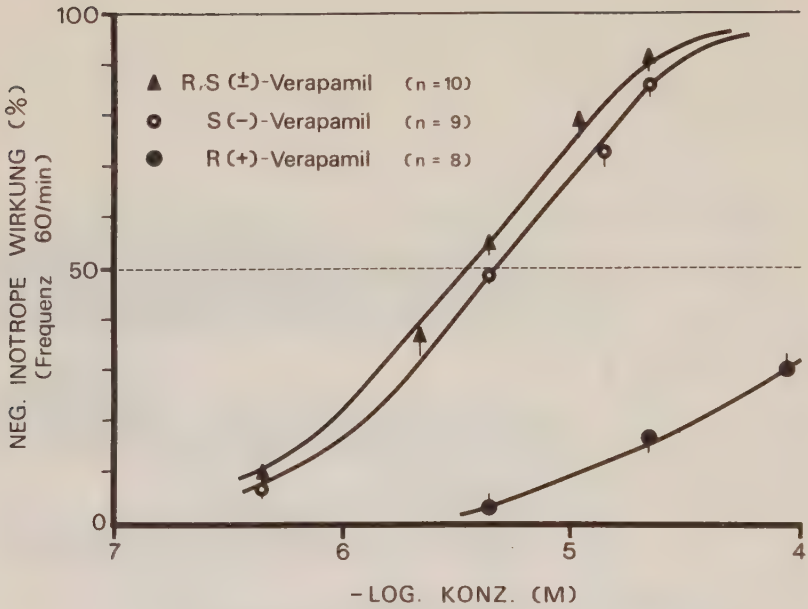


Abb. 18: Konzentrations-Wirkungskurven für den negativ inotropen Effekt der Verapamilenantiomere im Vergleich zu razemischem Verapamil.

Die gleichen Experimente wurden für die Isomere von Fendilin und Prenylamin durchgeführt. Ähnlich wie für Verapamil konnten auch im Falle des Fendilin qualitative und quantitative Wirkunterschiede zwischen den Isomeren gefunden werden (Abb. 19). In der Wirkqualität stimmen razemisches und linksdrehendes Fendilin (Th 313) überein, während das rechtsdrehende Enantiomer vorzugsweise bei niedriger Reizfrequenz wirkt, ohne die transitorischen Phänomene wesentlich zu beeeinflussen.

Die unterschiedlichen Wirkmuster der beiden Fendilinisomere finden ihren Niederschlag in den Konzentrations-Wirkungskurven (Abb. 20 und 21) für die Reizfrequenzen 6 und 60/min.

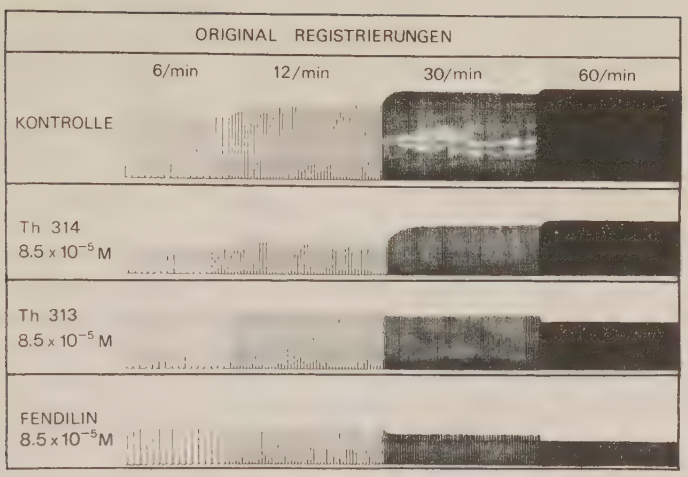


Abb. 19: Originalregistrierungen isoton kontrahierender Katzenpapillarmuskeln unter dem Einfluß razemischen Fendilins und seiner Isomere im Vergleich zu Kontrollbedingungen.
Th 314 = rechtsdrehendes Isomer
Th 313 = linksdrehendes Isomer.

Bei der niedrigen Reizfrequenz ist das rechtsdrehende, bei der hohen Reizfrequenz das linksdrehende Isomer stärker wirksam. Darüberhinaus machen diese Abbildungen den niedrigen isomerischen Quotienten für die negativ inotrope Wirkung der Isomere deutlich. Im Gegesatz zu Verapamil sind an der negativ inotropen Wirkung razemischen Fendilins die beiden Enantiomere zu annähernd gleichen Teilen beteiligt.

Für die Wirkung der Prenylaminisomere gelten wieder andere Gesetzmäßigkeiten. Die Enantiomere beeinflussen wie die razemische Ausgangsverbindung die Treppenphänomene nach Frequenzwechsel praktisch nicht und üben ihre inotropen Effekte unabhängig von der Reizfrequenz aus. Für die Wirkstärke ergeben sich jedoch sehr interessante isomerenspezifische

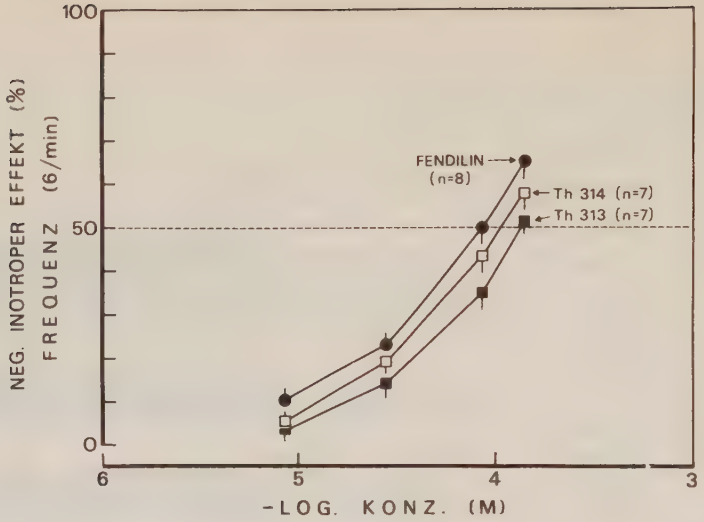


Abb. 20: Konzentrations-Wirkungskurven für den negativ inotropen Effekt von Fendilin und seinen Isomeren (Reizfrequenz 6/min).

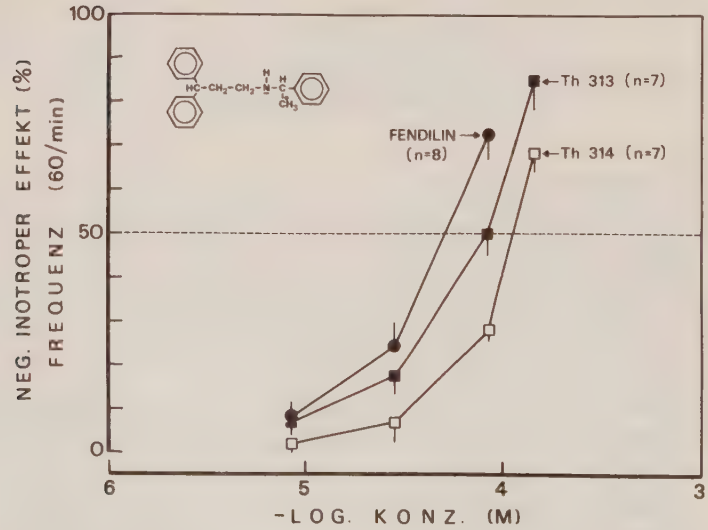


Abb. 21: Konzentrations-Wirkungskurven für den negativ inotropen Effekt von Fendilin und seinen Isomeren (Reizfrequenz 60/min).

Effekte. Der bei razemischem Prenylamin zu beobachtende schwach positiv inotrope Effekt niedriger Arzneistoffkonzentrationen bei niedrigen Reizfrequenzen (6 - 12/min) ist im wesentlichen dem rechtsdrehenden, der bei höherer Dosierung auftretende negativ inotrope Effekt insbesondere dem linksdrehenden Isomer zuzuordnen. Dies belegen auch die entsprechenden Konzentrations-Wirkungskurven für die inotropen Effekte der Untersuchungssubstanzen, wie sie in den Abb. 22 und 23 wiedergegeben sind.

Für die drei Kalziumantagonisten Verapamil, Prenylamin und Fendilin gilt übereinstimmend, daß zwischen ihren jeweiligen Isomeren ausgeprägte Unterschiede in der Qualität und Quantität ihrer negativ inotropen Wirkung zu beobachten sind. In allen drei Fällen ist die linksdrehende Verbindung dem Razemat ähnlicher als der rechtsdrehende Anteil. Quantitativ sind die Unterschiede bei Verapamil am stärksten, bei Fendilin am schwächsten ausgeprägt, wie aus der zusammenfassenden Darstellung (Tab. 8) hervorgeht.

Substanz	neg. inotrope Wirkung ED_{50} (M)	rel. negative inotr. Wirkung Verapamil = 1	isomerischer Quotient (-)/(+)
(±) Verapamil	3.5×10^{-6}	1	
(-) Verapamil	5.0×10^{-6}	0.7	122
(+) Verapamil	6.1×10^{-4}	0.006	
(±) Prenylamin	2.0×10^{-5}	0.18	
(-) Prenylamin	1.0×10^{-5}	0.35	6
(+) Prenylamin	6.0×10^{-5}	0.06	
(±) Fendilin	5.0×10^{-5}	0.07	
(-) Fendilin	8.5×10^{-5}	0.04	1.4
(+) Fendilin	1.2×10^{-4}	0.029	

Tab. 8: Negativ inotrope Wirkstärke und isomerische Quotienten für razemisches Verapamil, Prenylamin und Fendilin sowie die entsprechenden Enantiomere.

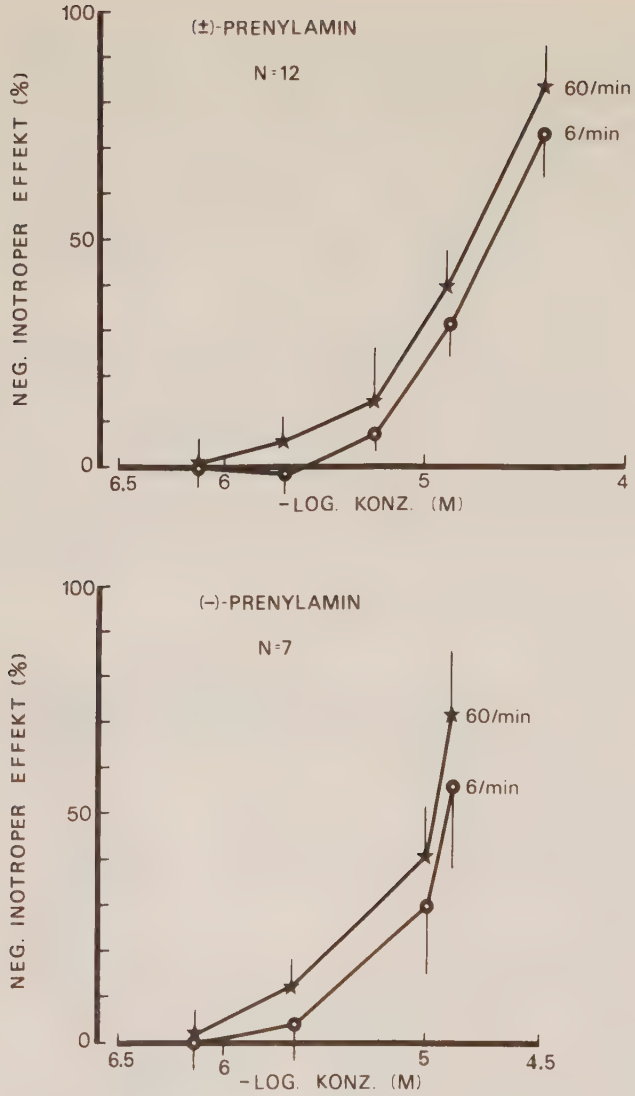


Abb. 22: Konzentrations-Wirkungskurven für razemisches und linksdrehendes Prenylamin (Reizfrequenzen 6 und 60/min)(RODENKIRCHEN et al., 1980).

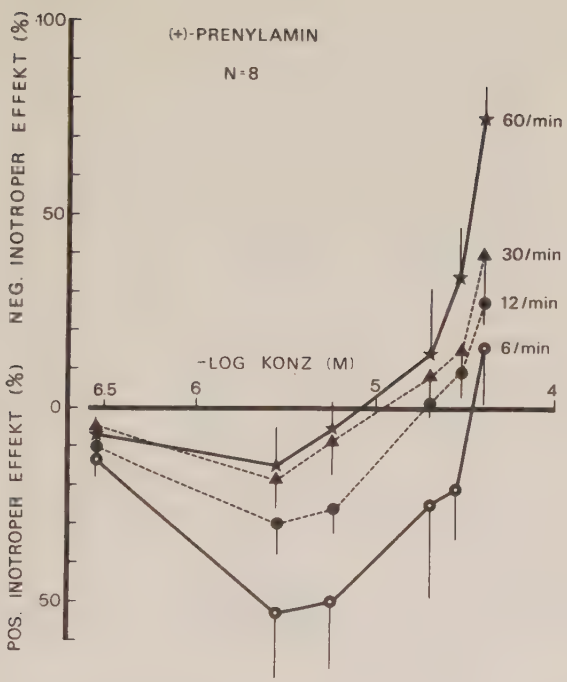


Abb. 23: Konzentrations-Wirkungskurven für die inotropen Effekte rechtsdrehenden Prenylamins. Man beachte die ausgeprägt positiv inotropen Wirkungen bei niedrigen Konzentrationen und niedrigen Reizfrequenzen (RODENKIRCHEN et al., 1980).

3.2. DIE R_M-WERTE DER UNTERSUCHUNGSSUBSTANZEN

Die R_M-Werte der kalziumantagonistischen Untersuchungssubstanzen sowie der Verapamilderivate wurden nach dem unter 2.5. beschriebenen Verfahren der Phasenumkehr-Dünnschichtchromatographie ermittelt. Vorversuche zur Auswahl der geeigneten Fließmittel ergaben, daß im Falle der Verapamilderivate Methanol und im Falle der kalziumantagonistischen Ausgangsverbindungen Aceton die beste Trennung der Untersuchungssubstanzen garantierte. Anschließend wurde mit Hilfe literaturüblicher Verfahren (z.B. BIAGI et al., 1975) die geeignete Fließmittelzusammensetzung zur chromatographischen Analyse der verschiedenen Untersuchungsgruppen ermittelt. Die unter 2.5. jeweils angegebenen Fließmittelzusammensetzungen sichern ein lineares Verhältnis zwischen R_M-Wert und der Konzentration des organischen Fließmittels (50% Aceton für die Kalziumantagonisten, 70% Methanol für die Verapamilderivate der Gruppe I und 80% Methanol für die lipophileren Derivate aus Gruppe II).
Die hier zusammengefaßten R_F- bzw. R_M-Werte stellen das Mittel aus drei Untersuchungen dar und lauten im einzelnen für die drei Gruppen wie folgt:

1) Kalziumantagonisten und Struktur-verwandte Pharmaka (RODENKIRCHEN, MANNHOLD et al., 1978):

Verbindung	R_F	R_M	f
Verapamil	0.32 (±0.006)	0.33 (±0.012)	5.78
Prenylamin	0.24 (±0.008)	0.51 (±0.016)	6.58
Fendilin	0.17 (±0.010)	0.68 (±0.020)	6.05
Bencyclan	0.16 (±0.007)	0.71 (±0.014)	4.9
Bepridil	—	—	—
Tiapamil	0.44 (±0.012)	0.11 (±0.024)	6.33
Mebeverin	0.27 (±0.012)	0.43 (±0.024)	6.11
Dilazep	0.19 (±0.006)	0.64 (±0.012)	4.31
Hexobendin	0.22 (±0.007)	0.55 (±0.014)	4.66
Aprindin	0.25 (±0.012)	0.48 (±0.024)	4.69

2) Verapamilderivate (Gruppe I):

Verbindung	R_F	R_M	f
Verapamil	0.29 (±0.008)	0.39 (±0.016)	5.784
D 600	0.30 (±0.014)	0.36 (±0.029)	5.835
D 557	0.24 (±0.012)	0.50 (±0.029)	5.795
PR 23	0.32 (±0.014)	0.32 (±0.028)	5.166
D 595	0.18 (±0.007)	0.65 (±0.019)	7.126
T 13	0.21 (±0.007)	0.58 (±0.019)	6.831
Sz 48	0.25 (±0.013)	0.48 (±0.029)	5.976
D 559	0.20 (±0.005)	0.61 (±0.013)	6.700
Sz 51	0.16 (±0.008)	0.72 (±0.027)	7.893

3) Verapamilderivate (Gruppe II):

Verbindung	R_F	R_M	f
Sz 45	0.34 (±0.01)	0.29 (±0.021)	5.646
D 784	0.36 (±0.008)	0.25 (±0.014)	5.784
D 894	0.38 (±0.012)	0.22 (±0.022)	7.892
F 3	0.23 (±0.003)	0.53 (±0.008)	9.536
F 8	0.12 (±0.005)	0.87 (±0.019)	10.000
Sz 117	0.06 (±0.005)	1.20 (±0.041)	12.108

In der letzten Spalte der Meßwerttabellen ist jeweils zusätzlich für alle Substanzen der sogenannte f-Wert nach NYS und REKKER (1974) aufgeführt. Die f-Werte stellen computerermittelte Literaturdaten dar, die hervorragend zur schnellen theoretischen Quantifizierung der Wirkstofflipophilie geeignet sind. Darüberhinaus ermöglichen sie eine Überprüfung der Güte experimentell bestimmter Meßwerte mit Hilfe des Interkorrelationstests; für die einzelnen Untersuchungsgruppen ergeben sich die folgenden Beziehungen:

1) Verapamilderivate (Gruppe I):

$R_M = 3.37\ f + 5.82$
$n = 9;\ s = 0.14;\ r = 0.95;\ p < 0.01$

2) Verapamilderivate (Gruppe II):

$R_M = 5.26\ f + 5.77$
$n = 6;\ s = 0.39;\ r = 0.91;\ p < 0.01$

Die erhaltenen hohen Interkorrelationswerte zeigen die ausgezeichnete Qualität der Meßwerte und damit die Eignung der Phasenumkehr-Dünnschichtchromatographie zur Quantifizierung der Wirkstofflipophilie an.

Im Vergleich der wichtigsten Stoffgruppen zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit stellen die hier untersuchten Kalziumantagonisten vom Typ der aliphatischen Amine neben den sehr hydrophilen Nitraten und den z.T. schwach lipophilen ß-Blockern die Substanzklasse mit der größten Fettlöslichkeit dar. Der Kalziumantagonist Verapamil ist beispielsweise etwa zehnmal lipophiler als der ß-Blocker Propranolol (MANNHOLD, 1977; HELLENBRECHT et al., 1973).
Die beobachtete hohe Lipophilie der Untersuchungssubstanzen hat vor allem pharmakokinetische Konsequenzen. Alle Verbindungen sind leicht membrangängig, zeigen hohe Plasmaeiweißbindung, werden stark metabolisiert und weisen eine entsprechend geringe Bioverfügbarkeit auf.
Für Verapamil konnte gezeigt werden, daß die Lipophilie für das pharmakodynamische Wirkprofil bedeutungslos ist (MANNHOLD et al., 1976, 1978, 1980, 1982).

3. DIE AMPLITUDEN-FREQUENZBEZIEHUNG UNTER DEM EINFLUSS VON QUATERNISIERUNGSPRODUKTEN

Bei der Wirkortanalyse von membranwirksamen, stickstoffhaltigen Arzneistoffen werden seit langem Quaternisierungsprodukte eingesetzt (siehe z.B. STRICHARTZ, 1973). Ein Verlust der Wirkung beim quaternisierten Stoff kann als indirekter Hinweis auf intrazelluläre bzw. an der Membraninnenseite gelegene Wirkorte gelten.

In der vorliegenden Arbeit sind Quaternisierungsprodukte[+)] der Kalziumantagonisten Verapamil und Bencyclan sowie der strukturverwandten herzaktiven Pharmaka Aprindin, Dilazep und Hexobendin auf ihre negativ inotrope Wirksamkeit getestet worden. Alle Verbindungen lagen als methylquaternisierte Hydrojodide vor (Strukturformeln siehe 7.3.). In Vorversuchen mit entsprechenden Dosen von Kaliumjodid (bis zu 10^{-4} M) konnte sichergestellt werden, daß das Anion keine negativ inotrope Eigenwirkung besitzt. Der Einfluß der Untersuchungssubstanzen auf die Amplituden-Frequenzbeziehung isoton kontrahierender Katzenpapillarmuskeln ist in den Abb. 24 und 25 im Vergleich zu den entsprechenden nicht quaternisierten Ausgangsverbindungen wiedergegeben. Aus diesen Abbildungen wird deutlich, daß bei den quaternisierten Verbindungen von Dilazep, Aprindin und Hexobendin die Wirkqualität erhalten bleibt. Ein Vergleich der Wirkstärke bei den Reizfrequenzen 6 und 60/min ist in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben. Die aufgeführten Daten zeigen, daß Quaternisierung bei den Kalziumantagonisten zum nahezu vollständigen Wirkverlust führt, während bei den strukturverwandten Pharmaka eine Restwirkung von bis zu 20% zu beobachten ist.

[+)] Für die Synthese der Quaternisierungsprodukte sei an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. F. Vögtle, Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Bonn, herzlich gedankt.

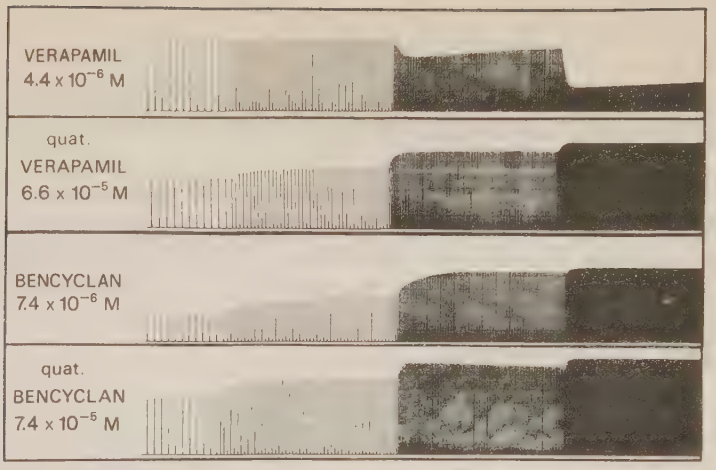


Abb. 24: Originalregistrierungen isoton kontrahierender Katzenpapillarmuskeln unter dem Einfluß N-methyl-quaternisierter Kalziumantagonisten im Vergleich zu den nicht quaternisierten Ausgangsverbindungen.

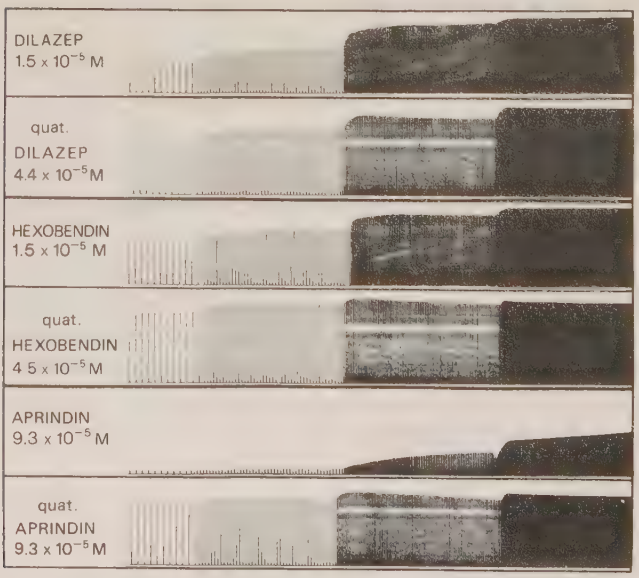


Abb. 25: Originalregistrierungen isoton kontrahierender Katzenpapillarmuskeln unter dem Einfluß N-methyl-quaternisierter negativ inotroper Pharmaka im Vergleich zu den nicht quaternisierten Ausgangsverbindungen.

Konz. mg/l	VERAPAMIL		Konz. mg/l	BENCYCLAN		DILAZEP		HEXOBENDIN		APRINDIN	
	6/min	60/min		6/min	60/min	6/min	60/min	6/min	60/min	6/min	60/min
2	8.6(±7)	57.0(±9)	3	17.9(±8)	3.1(±2)	5.1(±4)	4.9(±2)	8.8(±3)	2.5(±2)	17.3(±4)	3.2(±3)
5	28.9(±6)	78.7(±8)	10	63.1(±9)	14.3(±9)	36.7(±6)	20.0(±2)	37.3(±4)	26.9(±5)	65.1(±6)	28.7(±9)
10	54.6(±9)	94.0(±6)	30	93.9(±3)	55.1(±6)	71.9(±5)	58.1(±6)	61.5(±4)	45.8(±3)	92.7(±7)	57.6(±7)

Konz. mg/l	QUAT. VERAPAMIL		Konz. mg/l	QUAT. BENCYCLAN		QUAT. DILAZEP		QUAT. HEXOBENDIN		QUAT. APRINDIN	
	6/min	60/min		6/min	60/min	6/min	60/min	6/min	60/min	6/min	60/min
3	-	-	3	-	-	7.0(±4)	2.2(±1)	4.8(±5)	4.2(±3)	6.0(±3)	4.8(±3)
10	-	-	10	-	-	8.6(±4)	4.8(±2)	9.2(±4)	7.1(±4)	11.0(±3)	9.6(±6)
30	-	-	30	2.5(±2)	3.5(±3)	19.6(±8)	9.0(±1)	14.8(±4)	11.2(±8)	19.2(±6)	11.6(±5)

Tab. 9: Vergleich der negativ inotropen Wirkstärke der Untersuchungssubstanzen mit der Wirksamkeit der entsprechenden Quaternisierungsprodukte für die Reizfrequenzen 6 und 60/min.

3.4. DIE ZELLULÄRE LOKALISATION DER UNTERSUCHUNGSSUBSTANZEN

Die zelluläre Lokalisation der Testsubstanzen wurde mit Hilfe der LAMMA-Analyse untersucht (zur Methode siehe 2.2.). Methodische Voraussetzung, um die Analysen aussagekräftig durchführen zu können, war das Auffinden einer Markersubstanz, die es erlaubt, eine eindeutige Abgrenzung von Extra- und Intrazellulärraum zu gewährleisten. Das Röntgenkontrastmittel Joxaglinsäure erfüllt in idealer Weise die hier geforderten Voraussetzungen. Die Verbindung weist sechs Jodatome pro Molekül auf, so daß bei relativ geringer Kontrastmitteldosierung eine ausreichende Konzentration des Markeratoms Jod erreicht werden kann. Darüberhinaus ist die Membranpassage dieser Verbindung wegen des hohen Molekulargewichts (1300 Dalton), seiner geringen Lipophilie, sowie der 90%-igen Ionisation bei physiologischem pH entweder garnicht oder nur in geringem Maße möglich.

Vorversuche mit Kontrastmittelkonzentrationen bis zu 10^{-2} M ergaben außerdem keine Hinweise auf eine negativ inotrope Eigenwirkung dieser Substanz. Als Testsubstanzen dienten fluorierte Abwandlungsprodukte der kalziumantagonistischen Ausgangsverbindungen, weil der Fluorsubstituent einen geeigneten Arzneistoffindikator bei der Auswertung der LAMMA-Spektren darstellt. Auch für die fluorierten Abwandlungsprodukte konnte in Vorversuchen sichergestellt werden, daß ihre Wirkqualität mit derjenigen der Ausgangssubstanzen übereinstimmt. Aus diesen Ergebnissen darf auf ein gleichartiges Verteilungsmuster der Verbindungen geschlossen werden. Die Teststoffe wirkten 2 h bei einer Reizfrequenz von 30/min auf isoton kontrahierende Papillarmuskeln ein. Nach Gefriertrocknung,wie unter 2.2. beschrieben, konnten geeignete Dünnschnitte hergestellt werden, die als Präparate für die LAMMA-Analyse dienten.

Abb. 26 gibt die Spektren wieder, die mit der verapamilanalogen Verbindung T 13 erhalten wurden. Ein Vergleich der Spektren für Extra- bzw. Intrazellulärraum zeigt anhand der Peakhöhe für den Marker Fluorid, daß die Testsubstanz in etwa zehnfacher

Konzentration intrazellulär angereichert ist. Diese Befunde stützen die aus anderen Experimenten abgeleitete Hypothese, daß der wahrscheinliche Wirkort für die kalziumantagonistische Verapamilwirkung an der Innenseite des Sarkolemms[+)] zu suchen ist.

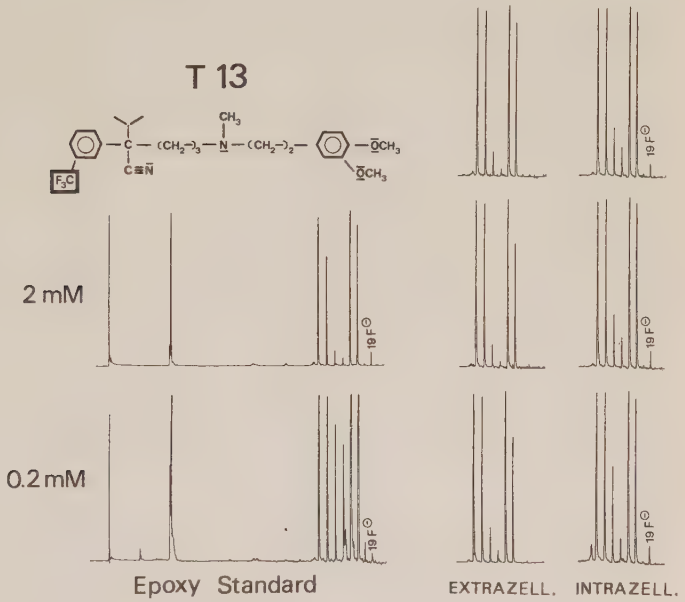


Abb. 26: LAMMA-Analyse der zellulären Lokalisation der verapamilanalogen Verbindung T 13 in Dünnschnitten von Katzenpapillarmuskeln. Die vorwiegend intrazelluläre Anreicherung läßt sich leicht aus der Peakhöhe des Arzneistoffmarkers 19 F^- ermitteln. Die obige Abbildung gibt die Spektren für die extra-/intrazelluläre Verteilung von T 13 anhand eines Einzelexperiments wieder.

[+)] PELZER et al. (1982) konnten in elektrophysiologischen Experimenten an kultivierten Herzzellen inzwischen zeigen, daß intrazellulär appliziertes D 890 (= quaternisiertes D 600) gleichartige Wirkungen ausübt wie die Ausgangsverbindung D 600, während extrazellulär appliziertes D 890 unwirksam ist.

3.5. DIE pK_a-WERTE DER UNTERSUCHUNGSSUBSTANZEN

Die pK_a-Werte wurden durch potentiometrische Mikrotitration (siehe 2.6.) bestimmt. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit der meisten Untersuchungssubstanzen wurden die Messungen in 40% Ethanol durchgeführt. Die unten aufgeführten Meßergebnisse sind die Mittelwerte aus drei Einzelbestimmungen:

Verbindung	pK_a Ethanol (40%)	pK_a berechnet für H_2O
Verapamil	7.99 (±0.015)	8.73
Prenylamin	8.74 (±0.015)	9.47
Fendilin	8.59 (±0.032)	9.33
Bencyclan	8.94 (±0.04)	9.68
Bepridil	8.65 (±0.03)	9.39
Tiapamil	7.74 (±0.01)	8.48
Mebeverin	9.07 (±0.02)	9.8
Dilazep	4.46 (±0.03) 8.14 (±0.02)	5.19 8.88
Hexobendin	4.04 (±0.015) 7.94 (±0.02)	5.09 8.68
Aprindin	3.79 (±0.02) 9.43 (±0.005)	4.53 10.16

Für Tiapamil konnte eine Vergleichsmessung zwischen Ethanol (40%) und Wasser durchgeführt und ein ΔpK_a von 0.74 ermittelt werden. Die Werte in der letzten Spalte obiger Tabelle geben die auf Wasser umgerechneten Meßergebnisse wieder. Anhand dieses Zahlenmaterials ist es möglich, den prozentualen Ionisationsgrad einer Untersuchungssubstanz für den physiologischen pH-Wert 7.4 auszurechnen:

Verbindung	Ionisationsgrad (%)	Verbindung	Ionisationsgrad (%)
Verapamil	95.5	Tiapamil	92.3
Prenylamin	99.2	Mebeverin	99.6
Fendilin	98.2	Dilazep	96.8
Bencyclan	99.5	Hexobendin	95.01
Bepridil	98.9	Aprindin	99.8

Die Untersuchungssubstanzen liegen nach unseren Messungen bei physiologischem pH alle mindestens zu 90 Prozent ionisiert vor. Dies bedeutet, daß mit größter Wahrscheinlichkeit die ionisierten Verbindungen die biologisch aktive Wirkform darstellen. Entsprechend dem Ionisationsgrad der jeweiligen Substanz ist daher nur ein bestimmter Anteil der jeweils eingesetzten Wirkstoffdosis für die Auslösung des pharmakologischen Effektes verantwortlich. Dies kann z.B. für die Durchführung quantitativer Struktur-Wirkungsanalysen von Bedeutung sein, wenn größere Unterschiede zwischen applizierter und aktiver Dosis vorhanden sind. Anhand der Umrechnungsformel

$$\log 1/C_{korr.} = \log 1/C + \log (1 + 10^{pH-pK}) \qquad (3.1)$$

ergeben sich für die untersuchten Kalziumantagonisten folgende Korrekturwerte der ED_{50} für den negativ inotropen Effekt:

Verbindung	Reizfrequenz 6/min		Reizfrequenz 60/min	
	$\log 1/EC_{50}$	Korr. Wert	$\log 1/EC_{50}$	Korr. Wert
Verapamil	4.72	4.74	5.45	5.47
Prenylamin	4.6	4.604	4.7	4.704
Fendilin	4.1	4.105	4.3	4.305
Bencyclan	4.7	4.702	4.19	4.192
Bepridil	—	—	—	—
Tiapamil	3.28	3.30	3.8	3.82
Mebeverin	4.62	4.622	4.35	4.352
Dilazep	4.64	4.65	4.45	4.46
Hexobendin	4.49	4.51	4.29	4.31
Aprindin	4.64	4.641	4.1	4.101

3.6. DIE QUALITATIVE STRUKTUR-WIRKUNGSANALYSE VON VERAPAMIL

Ein wesentliches Ziel der qualitativen Struktur-Wirkungsanalyse besteht darin, zwischen den essentiellen (pharmakophoren) und nicht essentiellen (haptophoren) Gruppen eines Arzneistoffmoleküls zu differenzieren. Die Untersuchungen einer nach vorgegebenen Kriterien ausgewählten Reihe von Derivaten einer Ausgangsverbindung erlauben es, diejenigen Molekülteile zu bestimmen, die für die Qualität eines definierten pharmakologischen Effektes verantwortlich sind. Qualitative Veränderungen der biologischen Wirkung drücken sich z.B. in einem andersartigen Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurve für das entsprechende Derivat aus.

Ein gebräuchliches und einfaches in vitro Testsystem zur Messung kalziumantagonistischer Effekte ist die negativ inotrope Wirkung in isolierten Präparaten, wie z.B. dem Katzenpapillarmuskel. Die Stärke des negativ inotropen Effektes verschiedener Ca-Antagonisten hängt in ausgeprägtem Maße von der jeweils benutzten Reizfrequenz ab (BAYER et al., 1975a, 1976, 1978). Aus diesem Grunde stellt die sogenannte Amplituden-Frequenzbeziehung ein besonders geeignetes Kriterium zur Ableitung qualitativer Struktur-Wirkungsbeziehungen für Ca-Antagonisten dar. Dabei umfaßten die Untersuchungen die Bestimmung der Amplituden-Frequenzbeziehung unter Gleichgewichtsbedingungen sowie die Bewertung der transitorischen Phänomene nach Frequenzwechsel.

Wie bereits unter 3.1. ausführlich beschrieben, hat Verapamil zwei charakteristische Effekte auf die Amplituden-Frequenzbeziehung:

1) Die biphasischen Treppenphänomene nach Frequenzwechsel werden verlangsamt,
2) die Amplituden-Frequenzbeziehung unter Gleichgewichtsbedingungen wird umgekehrt.

Dieses Wirkbild dient für die folgenden Betrachtungen als Kriterium für die Ableitung von qualitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen.

Auf Grund der hier beschriebenen Untersuchungen sind der tertiäre Aminostickstoff und die beiden Ringe als essentielle Molekülteile für die frequenzabhängig negativ inotrope Verapamilwirkung zu betrachten (MANNHOLD et al., 1978). Dies läßt sich aus den Untersuchungen schließen, die mit einer Reihe unterschiedlich am Aminostickstoff substituierter Verapamilderivate durchgeführt wurden. Das Spaltprodukt D 619 z.B. (Austausch des Homoveratrylrestes gegen eine Methylgruppe) wirkt bevorzugt bei niedrigen Reizfrequenzen, was zu einer Akzentuierung der Amplituden-Frequenzbeziehung führt. Das sekundäre Amin PR 22 (= N-desmethyl-Verapamil) hingegen senkt die Kontraktionsamplituden unabhängig von der jeweiligen Reizfrequenz, was zu einer Parallelverschiebung der Amplituden-Frequenzbeziehung führt. Diese im Vergleich zu Verapamil qualitativ andersartige negativ inotrope Wirkung drückt sich auch in einem flacheren Verlauf der Dosis-Wirkungskurven für diese Derivate aus.

Das Derivat D 594 (Austausch der Methyl- gegen eine Homoveratrylgruppe) wirkt qualitativ wie die Ausgangsverbindung Verapamil. Die beobachtete starke Minderung der Wirkstärke dieser Verbindung ist wahrscheinlich auf sterische Effekte - etwa im Sinne einer Hinderung der optimalen Rezeptoranpassung - zurückzuführen.

Von ganz besonderer Bedeutung sind die Ergebnisse, die mit dem Quaternisierungsprodukt H 1 gewonnen wurden. Solche Quaternisierungsprodukte sind als Permanentionen mit größter Wahrscheinlichkeit nicht in der Lage, Membranen zu passieren. Das völlige Ausbleiben einer negativ inotropen Wirkung bei dem Quaternisierungsprodukt H 1 könnte aus diesem Grunde auf einen intrazellulären bzw. an der Innenseite des Plasmalemms gelegenen Wirkort des Ca-Antagonisten Verapamil hinweisen.

Die Substituenten der Benzolringe sowie die Isopropylgruppe haben sich im weiteren Verlauf der Untersuchungen als nicht essentielle Molekülteile erwiesen. Sie ändern die Qualität der Wirkung nicht, haben aber einen ausgeprägten Einfluß auf die Wirkstärke.

Unter den Ringabwandlungsprodukten sind Derivate mit unterschiedlicher Substitution am Ring A (näher am asymmetrischen Kohlenstoff gelegen) aus folgenden Gründen von ganz besonderem Interesse:

1) Die frequenzabhängig negativ inotrope Wirkung von razemischem Verapamil ist im wesentlichen durch das linksdrehende S-Enantiomer bestimmt (BAYER et al., 1975b). Die determinierenden Molekülteile für diese Wirkung sollten daher in der Nähe des asymmetrischen Kohlenstoffs lokalisiert sein.
2) Darüberhinaus beeinflußt eine Veränderung des Substitutionsmusters an Ring A die biologische Wirkstärke erheblich ausgeprägter als die gleiche Veränderung an Ring B. Zum Beispiel ist der Metabolit PR 23 (p-O-Demethylierung an Ring A) dreimal schwächer wirksam als Verapamil, während der Metabolit PR 24 (p-O-Demethylierung an Ring B) nur 1.2-mal schwächer wirkt (Abb. 27).

In einer ersten Versuchsreihe sind 10 Verbindungen mit unterschiedlicher Substitution an Ring A (Strukturformeln siehe 7.2.1.) auf ihre negativ inotrope Wirkung untersucht worden. Alle Verbindungen dieser Serie kehren die AFB um (siehe Abb. 28); die entsprechenden Dosis-Wirkungskurven für die Reizfrequenz 60/min zeigen einen parallelen Verlauf (Abb. 29). Die Mitglieder dieser Derivatereihe üben ihren negativ inotropen Effekt offensichtlich über einen identischen molekularen Mechanismus aus. Die unterschiedliche Wirkstärke der Untersuchungssubstanzen spiegelt sich in den ED_{50}-Werten wieder: Die wirksamste Verbindung (D 595) hat einen ED_{50}-Wert von 7.9×10^{-7} M, die schwächste (Sz 51) einen ED_{50}-

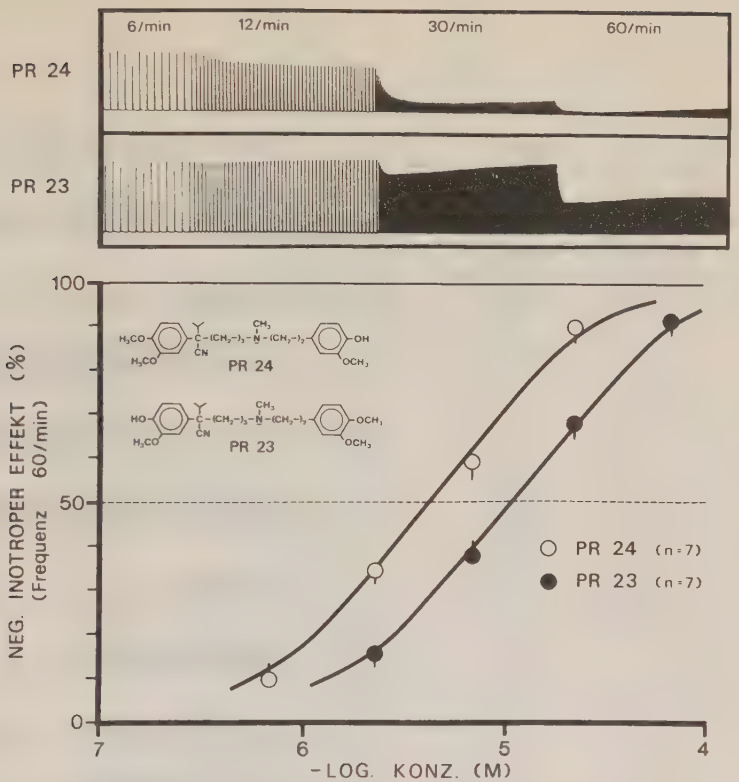


Abb. 27: Oberer Bildteil: Originalregistrierungen isoton kontrahierender Katzenpapillarmuskeln unter dem Einfluß der Metaboliten PR 24 und PR 23.
Unterer Bildteil: Konzentrations-Wirkungskurven für den negativ inotropen Effekt von PR 24 und PR 23 bei der Reizfrequenz 60/min.
EC_{50} für PR 24: 4.3×10^{-6} M
EC_{50} für PR 23: 1.07×10^{-5} M
(MANNHOLD et al., 1981)

Wert von 3×10^{-5} M. Ein Vergleich der eingesetzten Ringsubstituenten zeigt, daß vor allem Halogenderivate starke negativ inotrope Effekte ausüben. Besonders interessant erscheint ein Vergleich der beiden stellungsisomeren Derivate: Die Verbindung D 846 mit zwei Methoxysubstituenten in 2,6-

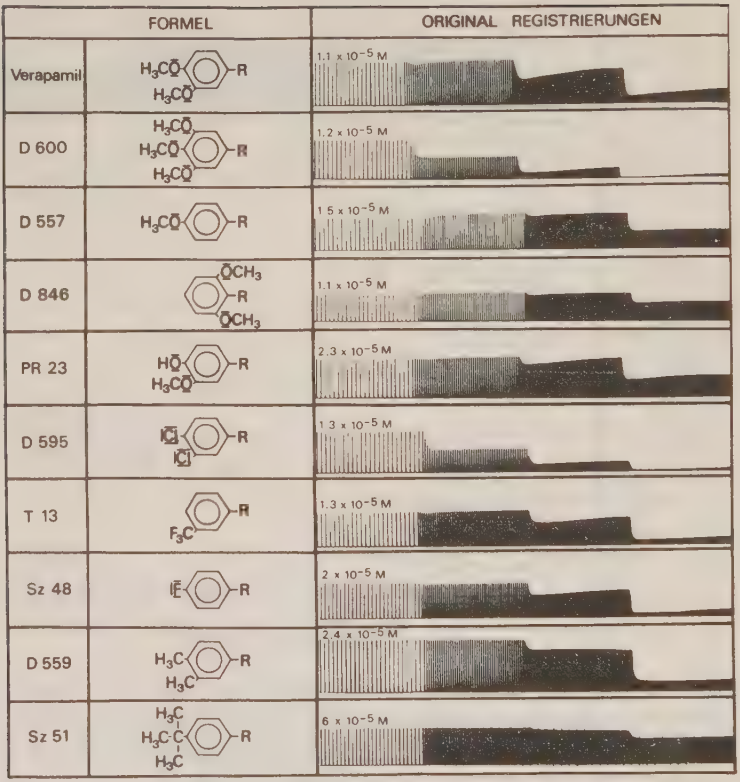


Abb. 28: Originalregistrierungen isoton kontrahierender Katzenpapillarmuskeln unter dem Einfluß von Verapamilderivaten der Gruppe I (MANNHOLD et al., (1981).

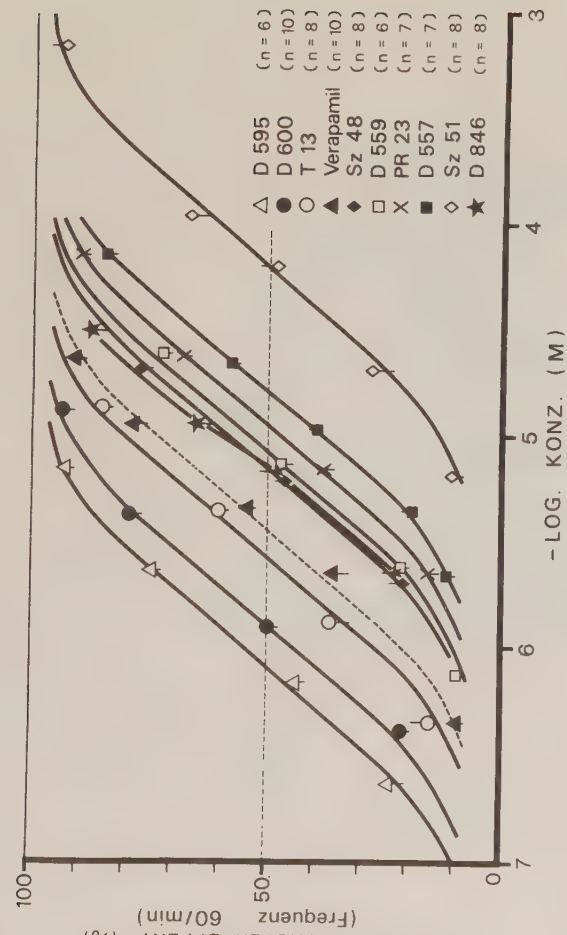


Abb. 29: Konzentrations-Wirkungskurven für den negativ inotropen Effekt der Verbindungen aus Gruppe I für die Reizfrequenz 60/min. Die ermittelten Kurven zeigen einen parpallelen Verlauf mit übereinstimmender Anstiegssteilheit; d.h. der Mechanismus der negativ inotropen Wirkung ist für die hier untersuchten Substanzen identisch (MANNHOLD et al., 1981).

Stellung ist nur halb so wirksam wie Verapamil mit zwei Methoxysubstituenten in 3,4-Stellung. Die Bedeutung sterischer Effekte im Sinne einer optimalen Rezeptoranpassung könnte die Ursache für die beobachteten Wirkunterschiede sein.

In einer zweiten Untersuchungsreihe sind Ringabwandlungsprodukte untersucht worden, um insbesondere die Bedeutung von sterischen und hydrophoben Eigenschaften aufzuklären. Diese Derivatereihe umfaßt Verbindungen, die an beiden Ringen (A und B) symmetrisch in 3,5-Stellung alkoxyliert sind (Gruppe II in 7.2.1.). Als Referenzsubstanz dient ein an beiden Ringen unsubstituiertes Derivat (Sz 45). Alle Verbindungen dieser Reihe mit Ausnahme von F 8 und Sz 117 kehren die Amplituden-Frequenzbeziehung um und verlangsamen die biphasischen Treppenphänomene nach plötzlichem Frequenzwechsel (Abb. 30). F 8 und Sz 117 kehren die Amplituden-Frequenzbeziehung nicht um; d.h. sie üben ihren negativ inotropen Effekt über einen qualitativ andersartigen Mechanismus aus als die Ausgangsverbindung Verapamil.

In Abb. 31 sind die entsprechenden Dosis-Wirkungskurven für die Reizfrequenz 60/min dargestellt. Außer für F 8 und Sz 117 ist der Kurvenverlauf parallel. Auch diese Tatsache bestätigt den abweichenden Wirkungsmechanismus dieser beiden Verbindungen. Ein Vergleich der ED_{50}-Werte ergibt, daß die negativ inotrope Wirkstärke mit zunehmender Lipophilie bzw. zunehmendem Substituentenvolumen abnimmt.

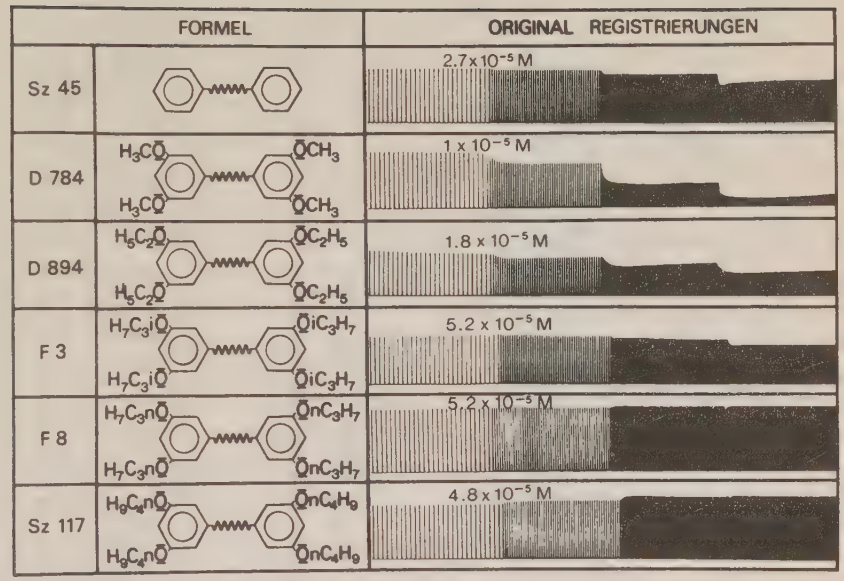


Abb. 30: Originalregistrierungen isotonisch kontrahierender Katzenpapillarmuskeln unter dem Einfluß von Verapamilderivaten der Gruppe II. Während Sz 45, D 784, D 894 und F 3 qualitativ wie Verapamil wirken, kehren F 8 und Sz 117 weder die Amplituden-Frequenzbeziehung unter Gleichgewichtsbedingungen um noch verlangsamen sie die biphasischen Treppen nach Frequenzwechsel (MANNHOLD et al., 1981).

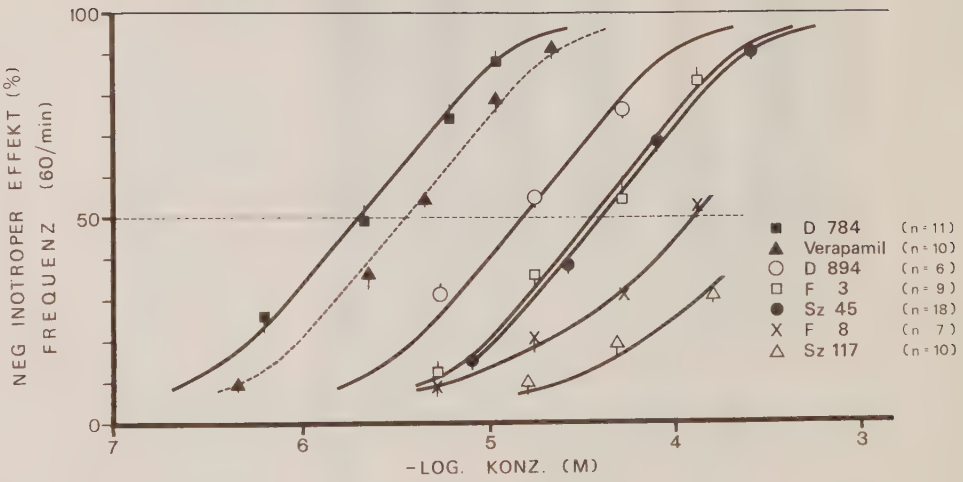


Abb. 31: Konzentrations-Wirkungskurven für den negativ inotropen Effekt von Verbindungen der Gruppe II bei der Reizfrequenz 60/min. Außer für F 8 und Sz 117 zeigen die Kurven einen parallelen Verlauf. Der Wirkmechanismus dieser Verbindungen stimmt offenbar nicht mit dem von Verapamil überein. Für Sz 117 konnte selbst bei einer Konzentration von 1.6×10^{-4} M kein EC_{50}-Wert erhalten werden (MANNHOLD et al., 1981).

DIE QUANTITATIVE STRUKTUR-WIRKUNGSANALYSE VON VERAPAMIL

1. DIE POLARISIERBARKEIT UND DAS DIPOLMOMENT VERAPAMILANALOGER BENZOLDERIVATE

Die Polarisierbarkeit und das Dipolmoment von Pharmakonteilstrukturen stellen physikalisch-chemische Moleküleigenschaften dar, denen große Bedeutung bei der Ausbildung und Stabilisierung von Arzneistoff-Rezeptorwechselwirkungen zukommen kann. In der vorliegenden Arbeit interessieren vor allem Daten für den unterschiedlich substituierten Benzolring in der Nähe des asymmetrischen Kohlenstoffs im Verapamilmolekül, um für ringvarierte Verapamilderivate entsprechende Struktur-Wirkungsanalysen durchführen zu können. Zur Erzielung größerer Meßgenauigkeiten sind Benzolderivate mit verapamilanalogem Substitutionsmuster als relevante Teilstrukturen in die hier beschriebenen Messungen eingegangen (Strukturformeln siehe 7.5). Die Polarisierbarkeitswerte wurden nach dem unter 2.7. beschriebenen Verfahren aus den entsprechenden Brechungsindices (n) anhand der LORENZ-LORENTZ-Gleichung errechnet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen faßt Tabelle 10 zusammen:

Verbindung	n	MG	d	$\bar{\alpha}'$
Benzol	1.4971	78.12	0.879	1.031
Veratrol	1.5298	138.17	1.084	1.560
Trimethoxybenzol	1.5269	168.19	1.250	1.639
Anisol	1.5122	108.14	0.993	1.296
Guajakol	1.5386	124.14	1.129	1.364
Dichlorbenzol	1.5468	147.00	1.305	1.416
Benzotrifluorid	1.4113	146.11	1.190	1.209
Fluorbenzol	1.4618	96.11	1.025	1.021
o-Xylol	1.5008	106.17	0.880	1.408
t.-Butylbenzol	1.4886	134.22	0.866	1.772

Tab. 10: Ergebnisse der Polarisierbarkeitsbestimmung für verapamilanaloge Benzolderivate. n = Brechungsindex (für λ = 632.8 nm); d = Dichte; $\bar{\alpha}'$ = Polarisierbarkeit (x 10^{-23}).

Die Dipolmomente der Benzolderivate wurden mit dem Dipolmeter DM 01 bestimmt (zum Verfahren siehe 2.8.). Bei der hier angewandten Methode werden die Brechungsindices n (Verfahren siehe 2.8.) und die Dielektrizitätskonstanten ϵ für eine Verdünnungsreihe der Benzolderivate in Tetrachlorkohlenstoff bestimmt. Zur Ermittlung der ϵ-Werte ist die Aufstellung einer Eichgeraden erforderlich, die die Umrechnung gemessener Skalenteile am Dipolmeter in ϵ-Werte erlaubt. Im vorliegenden Fall wurde sie mit Hilfe der Substanzen Cyclohexan, Benzol und Tetrachlorkohlenstoff aufgestellt.
Für die neun untersuchten Benzolderivate wurden auf diese Weise die folgenden Ergebnisse ermittelt:

$m_1 + m_2$	m_2	w_2	ϵ_{12}	$\epsilon_{12}-\epsilon_1$	n_{12}	$n_{12}^2 - n_1^2$
Veratrol						
80.6543	4.05103	0.05023	2.381	0.148	1.4656	19.9×10^{-3}
79.1332	0.7820	0.00988	2.262	0.029	1.4600	3.5×10^{-3}
80.8950	0.1781	0.00220	2.239	0.006	1.4591	8.75×10^{-4}
79.6886	0.1092	0.00137	2.237	0.004	1.4589	2.92×10^{-4}
Trimethoxybenzol						
81.2165	3.98951	0.0491	2.566	0.333	1.4653	19.01×10^{-3}
79.9004	0.9052	0.0113	2.307	0.074	1.4605	4.96×10^{-3}
80.3161	0.2112	0.00263	2.250	0.017	1.4601	3.79×10^{-3}
79.7503	0.1042	0.00131	2.241	0.008	1.4592	1.16×10^{-3}
Anisol						
154.1285	8.0442	0.0522	2.395	1.800	1.4640	12.75×10^{-3}
155.4521	6.0864	0.0392	2.355	1.760	1.4622	7.59×10^{-3}
156.6132	4.0964	0.0262	2.314	1.720	1.4615	5.43×10^{-3}
158.1498	2.0314	0.0128	2.273	1.678	1.4604	2.45×10^{-3}
158.7301	1.0027	0.0062	2.253	1.658	—	—

$m_1 + m_2$	m_2	w_2	ϵ_{12}	$\epsilon_{12}-\epsilon_1$	n_{12}	$n_{12}^2 - n_1^2$
Guajakol						
156.9072	8.0790	0.0515			1.4654	16.82×10^{-3}
157.9567	4.0944	0.0259	2.482	1.887	1.4629	9.5×10^{-3}
158.3529	2.0201	0.0128	2.356	1.762	1.4611	4.34×10^{-3}
157.7740	0.4944	0.0031	2.264	1.669	1.4599	8.15×10^{-3}
158.9336	0.1047	0.0007	2.240	1.645	—	—
1,2-Dichlorbenzol						
157.1884	8.0385	0.0512	2.598	2.003	1.4652	16.28×10^{-3}
158.1042	6.0328	0.0382	2.505	1.910	1.4632	10.58×10^{-3}
157.8634	4.0778	0.0258	2.417	1.823	1.4618	6.51×10^{-3}
159.4725	2.0721	0.0130	2.284	1.689	1.4601	1.36×10^{-3}
158.8624	1.0279	0.0065	2.280	1.684	—	—
Benzotrifluorid						
156.2314	8.0483	0.0515	2.656	2.061	1.4551	-13.03×10^{-3}
157.5448	6.0394	0.0383	2.546	1.951	1.4558	-11.13×10^{-3}
157.5108	4.0231	0.0255	2.443	1.848	1.4566	-8.68×10^{-3}
159.1813	2.0681	0.0129	2.340	1.745	1.4576	-5.70×10^{-3}
159.7350	1.0312	0.0065	2.287	1.692	1.4584	-3.53×10^{-3}
Fluorbenzol						
154.4796	7.9843	0.0512	2.450	1.855	1.4596	—
156.6757	4.0700	0.0259	2.344	1.749	1.4596	—
157.8690	1.9965	0.0126	2.287	1.692	1.4596	—
158.7424	0.5580	0.0035	2.248	1.654	1.4596	—
158.8708	0.1340	0.0008	2.238	1.643	1.4596	—
o-Xylol						
152.5469	7.9439	0.0521	2.270	1.675	1.4640	12.75×10^{-3}
155.6965	4.0239	0.0258	2.252	1.657	1.4620	6.92×10^{-3}
161.0709	2.0928	0.0129	2.244	1.649	1.4611	4.34×10^{-3}
157.9025	0.5382	0.0035	2.237	1.642	1.4600	8.15×10^{-3}
158.7070	0.1798	0.0011	2.235	1.640	—	—

tert.-Butylbenzol						
$m_1 + m_2$	m_2	w_2	ϵ_{12}	$\epsilon_{12}-\epsilon_1$	n_{12}	$n_{12}^2 - n_1^2$
154.3969	6.0125	0.0389	2.244	1.649	1.4614	5.15×10^{-3}
155.9767	4.0192	0.0258	2.240	1.646	1.4604	2.44×10^{-3}
156.7067	3.0269	0.0193	2.239	1.645	1.4600	1.09×10^{-3}
157.3151	2.0714	0.0132	2.238	1.643	—	—
157.7625	1.0728	0.0068	2.236	1.641	—	—

Für die Funktionen $\epsilon_{12} - \epsilon_1 = f(w_2)$ und $n_{12}^2 - n_1^2 = f(w_2)$ wurden folgende Steigungen der jeweiligen Regressionsgeraden errechnet:

Verbindung	a_ϵ	a_n
Veratrol	2.951	0.399
Trimethoxybenzol	6.810	0.354
Anisol	3.085	0.252
Guajakol	9.578	0.602
1,2-Dichlorbenzol	7.569	0.385
Benzotrifluorid	8.188	-0.209
Fluorbenzol	4.216	—
o-Xylol	0.673	0.237
t.-Butylbenzol	0.234	0.207

Aus diesen Werten ergeben sich anhand der Bestimmungsgleichung (2.65) folgende Dipolmomente:

Verbindung	Dipolmoment (DEBYE)
Veratrol	1.34
Trimethoxybenzol	2.34
Anisol	1.25
Guajakol	2.39
1,2-Dichlorbenzol	2.33
Benzotrifluorid	2.51
Fluorbenzol	1.44
o-Xylol	0.49
t.-Butylbenzol	0.14

5.7.2. DIE ERGEBNISSE DER HANSCH-ANALYSE

Als erste Derivatereihe sind 9 Verbindungen mit unterschiedlicher Substitution am Benzolring A (siehe auch Gruppe I in 7.2.) getestet worden. Die qualitative Struktur-Wirkungsanalyse hat ergeben, daß die Substituenten am Ring keinen Einfluß auf die Art, sondern nur auf die Stärke des negativ inotropen Effektes ausüben (→ gleiches Wirkmuster und paralleler Verlauf der Dosis-Wirkungskurven). Die für die Reizfrequenz 60/min ermittelten DWK ergaben ED_{50}-Werte, die zwischen 7.9×10^{-7} M für D 595 und 3×10^{-5} für Sz 51 liegen. Einzelkorrelationen dieser ED_{50}-Werte (Ergebnisse siehe Tab. 11) mit lipophilen, sterischen und elektronischen Substituentenparametern (numerische Werte siehe Tab. 12) zeigen, daß die negativ inotrope Wirkstärke im wesentlichen von den elektronischen Eigenschaften der Ringsubstituenten abhängt. Die beste Korrelation ergibt sich mit der Feldkonstanten F, die die induktiven Effekte von Ringsubstituenten quantifiziert:

Parameter	Regressionsgleichung	s	r	F	p
σ	$5.30(\pm0.29) + 1.23(\pm0.98)\sigma$	0.37	0.75	8.80	<0.05
F	$4.77(\pm0.26) + 0.81(\pm0.53)F$	0.33	0.81	12.82	<0.01
R	$5.24(\pm0.43) - 0.12(\pm1.45)R$	0.55	0.08	0.01	>0.05
π	$5.27(\pm0.43) + 0.03(\pm0.57)\pi$	0.55	0.05	0.02	>0.05
f	$5.52(\pm0.43) - 0.04(\pm0.54)f$	0.55	0.06	0.03	>0.05
R_M	$5.60(\pm0.43) - 0.61(\pm3.30)R_M$	0.55	0.16	0.19	>0.05
B_1	$4.17(\pm0.42) + 0.29(\pm0.97)B_1$	0.54	0.25	0.48	>0.05
B_2, B_3	$3.97(\pm0.41) + 0.29(\pm0.65)B_{2,3}$	0.52	0.37	1.13	>0.05
B_4	$4.67(\pm0.41) + 0.11(\pm0.29)B_4$	0.52	0.33	0.87	>0.05
L	$3.67(\pm0.38) + 0.17(\pm0.26)L$	0.48	0.50	2.28	>0.05
MR	$5.22(\pm0.43) + 0.006(\pm0.07)MR$	0.55	0.07	0.04	>0.05
MV	$5.17(\pm0.43) + 0.002(\pm0.02)MV$	0.55	0.07	0.03	>0.05
E_S	$5.35(\pm0.43) - 0.03(\pm0.54)E_S$	0.55	0.05	0.02	>0.05

Tab. 11: Regressionsanalyse der Verapamilderivate aus Gruppe I.
s = Standardabweichung F = Fisher-Test Wert
r = Korrelationskoeff. p = statistische Signifikanz

	Verap.	D 600	D 557	PR 23	D 595	T 13	Sz 48	D 559	Sz 51	Sz 45	D 784	D 894	F 3
σ	-0.15	-0.03	-0.27	-0.25	0.60	0.42	0.06	-0.24	-0.20	0	0.24	0.20	0.20
	-0.30	-0.18	-0.42	-0.40	0.45	0.27	-0.09	-0.39	-0.35	0	0.48	0.40	0.40
F	0.82	1.23	0.41	0.90	1.37	0.62	0.71	-0.10	-0.10	0	0.82	0.72	0.96
	1.64	2.05	1.23	1.72	2.19	1.44	1.53	0.72	0.72	0	1.64	1.44	1.92
R	-0.67	-0.84	-0.50	-0.81	-0.22	0.07	-0.34	-0.19	-0.14	0	-0.34	-0.30	-0.50
	-1.34	-1.51	-1.17	-1.48	-0.89	-0.60	-1.01	-0.86	-0.81	0	-0.68	-0.60	-1.00
π	0.09	0.21	-0.03	-0.49	1.50	1.10	0.15	1.18	1.88	0	0.24	1.24	2.00
	0.18	0.30	0.06	-0.40	1.59	1.19	0.24	1.27	1.97	0	0.48	2.48	4.00
f	5.784	5.885	5.795	5.166	7.126	6.831	5.976	6.700	7.893	5.646	5.784	7.892	9.536
R_M	0.390	0.361	0.497	0.319	0.649	0.577	0.478	0.611	0.722	0.291*	0.265*	0.417*	0.529*
B_1	3.70	4.05	3.35	3.70	4.60	3.98	3.35	4.04	4.59	3.00	3.70	3.70	3.70
	7.40	7.75	7.05	7.40	8.30	7.68	7.05	7.74	8.29	6.00	7.40	7.40	7.40
$B_{2,3}$	4.80	5.70	3.90	4.25	4.60	4.44	3.35	4.80	4.86	3.00	4.80	4.80	4.80
	9.60	10.50	8.70	9.05	9.40	9.24	7.05	9.60	9.66	6.00	9.60	9.60	9.60
B_4	6.74	8.61	4.87	5.80	4.60	4.61	3.35	5.08	4.97	3.00	6.74	7.72	8.22
	13.48	15.35	11.61	12.54	11.34	11.35	10.09	11.82	11.71	9.00	13.48	15.44	16.44
L	10.02	11.94	8.10	8.78	9.10	7.42	6.77	8.06	8.23	6.18	10.02	11.90	11.24
	20.04	21.96	18.12	18.80	19.12	17.44	16.79	18.08	18.25	12.36	20.04	23.80	22.48
MV	91.94	115.56	68.32	63.67	60.82	61.91	44.91	77.86	96.12	44.70	91.94	124.50	
	183.88	207.50	160.26	155.61	152.76	153.85	136.85	169.80	188.06	89.40	183.88	249.00	
MR	16.77	23.61	9.93	11.75	13.09	7.08	2.96	12.33	21.68	3.09	16.77	25.97	33.15
	33.54	40.38	26.70	28.52	29.86	23.85	19.73	29.10	38.45	6.18	33.54	51.94	70.30
E_S	2.62	2.07	3.17	2.62	1.78	1.35	3.26	1.24	0.94				
log 1/C	5.46	5.91	4.80	4.97	6.10	5.59	5.18	5.09	4.52	4.40	5.70	4.82	4.46

Tab. 12: Satz der numerischen Werte physiko-chemischer Substituentenparameter, die für quantitative Struktur-Wirkungsanalysen in dieser Arbeit eingesetzt werden: σ, π und MR-Werte sind aus HANSCH et al. (1973), F- und R-Werte aus NORRINGTON et al. (1975), B_1-B_4- und L-Werte aus VERLOOP et al. (1976), MV- und E_S-Werte aus CRAIG (1971) und die f-Werte aus NYS und REKKER (1974) entnommen. Die R_M-Werte stellen eigene experimentelle Daten dar. In der letzten Zeile sind die logarithmierten Kehrwerte der ED_{50}-Werte aufgeführt. Die oberen Werte in den einzelnen Spalten beziehen sich auf Substitution an Ring A (siehe 7.2.); die unteren Werte auf Ring A und Ring B Substitution. Die mit Stern gekennzeichneten R_M-Werte sind in einem anderen Fließmittel bestimmt worden (siehe 2.5.).

$$\log 1/ED_{50} = 4.77(\pm 0.26) + 0.81(\pm 0.53)F \qquad (3.2)$$

$n = 9$; $s = 0.33$; $r = 0.81$; $F = 12.81$; $p < 0.01$

Wie aus Tabelle 11 hervorgeht, sind Korrelationen mit hydrophoben bzw. sterischen Parametern nicht signifikant. Unter den eingesetzten Lipophilie-Parametern wurden die numerischen Werte für π und f der Literatur entnommen, während die R_M- bzw. ΔR_M-Werte in unserem Labor bestimmt wurden. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind unter 3.2. zusammengefaßt. Die Qualität sowohl der eigenen als auch der Literaturdaten läßt sich sehr gut anhand des Interkorrelationstestes ermitteln, der Werte von 0.94 (R_M gegen π) bzw. 0.95 (R_M gegen f) ergab. Die Verwendbarkeit von Literaturdaten für eine theoretische Lipophilieabschätzung von Arzneistoffmolekülen wird auf diese Weise eindrucksvoll belegt. Die hier angesprochenen Interkorrelationstests sind - wie in 2.3.3.4. bereits ausgeführt - eine wesentliche Voraussetzung für die Durchführung von multiplen linearen Regressionsanalysen, da nur voneinander unabhängige Parameter gleichzeitig eingesetzt werden dürfen. Die Ergebnisse solcher Tests für die numerischen Werte der Ringsubstituenten sind in den Tabellen 13 und 15 dargestellt.

Da elektronische Eigenschaften die entscheidenden Strukturparameter darstellen, wurden in Anlehnung an die Arbeiten von GILL (1965) Polarisierbarkeit (α) und Dipolmoment (μ) für verapamilanaloge Benzolderivate ermittelt (siehe 3.7.1.). Einzelkorrelationen der negativ inotropen Wirkung mit diesen Daten ergaben:

$$\log 1/ED_{50} = -0.10(\pm 2.1)\alpha + 5.44(\pm 0.44) \qquad (3.3)$$

$n = 9$; $s = 0.55$; $r = 0.05$; $F = 0.02$; p = n.s.

$$\log 1/ED_{50} = 0.42(\pm 0.37)\mu + 4.63(\pm 0.31) \qquad (3.4)$$

$n = 9$; $s = 0.39$; $r = 0.71$; $F = 7.01$; $p < 0.05$

Nur die Korrelation mit dem Dipolmoment ergibt ein signifikantes Ergebnis.

Hierbei ist allerdings zu bedenken, daß für μ eine sehr hohe Interkorrelation mit dem F-Wert von 0.85 vorliegt. Aufgrund des Korrelationsergebnisses mit α können induzierte Dipolwechselwirkungen als Bindungsbeiträge ausgeschlossen werden.

Korrelationen der pharmakologischen Daten mit zwei Substituentenparametern (siehe auch Tab. 14) durch Kombination der Feldkonstanten F mit verschiedenen hydrophoben bzw. sterischen Parametern ergeben geringfügige, aber statistisch nicht signifikante Verbesserungen der Ergebnisse. Das beste Resultat erhält man mit der Parameter-Kombination aus Feldkonstanter F und dem TAFT'schen E_S-Wert:

$$(\log 1/ED_{50})_{stand.} = 0.96(\pm 0.49)F - 0.41(\pm 0.49)E_S \qquad (3.5)$$

$n = 9$; $s = 0.27$; $r = 0.89$; $F = 11.26$; $p < 0.05$

Nahezu identische Werte ergibt die Korrelation der biologischen Wirkung mit der Parameter-Kombination F und π:

$$(\log 1/ED_{50})_{stand.} = 0.81(\pm 0.50)F + 0.30(\pm 0.50)\pi \qquad (3.6)$$

$n = 9$; $s = 0.28$; $r = 0.88$; $F = 10.71$; $p < 0.05$

Parameterkombinationen aus μ und einem sterischen Parameter verschlechtern die Güte der Korrelation und bestätigen die herausragende Bedeutung der Feldkonstante. Außerdem wird so bewiesen, daß die gute Einzelkorrelation mit dem Dipolmoment auf die hohe Interkorrelation mit F zurückzuführen ist.

$$(\log 1/ED_{50})_{stand.} = 0.36(\pm 0.43)\pi + 0.84(\pm 0.43)\mu \qquad (3.7)$$

$n = 9$; $s = 0.37$; $r = 0.78$; $F = 4.77$; p = n.s.

$$(\log 1/ED_{50})_{stand.} = 0.22(\pm 0.41)MR + 0.75(\pm 0.41)\mu \qquad (3.8)$$

$n = 9$; $s = 0.40$; $r = 0.74$; $F = 3.57$; p = n.s.

$$(\log 1/ED_{50})_{stand.} = -0.23(\pm 0.42)E_S + 0.76(\pm 0.42)\mu \qquad (3.9)$$

$n = 9$; $s = 0.40$; $r = 0.74$; $F = 3.68$; p = n.s.

	σ	F	R	π	f	R_M	B_1	$B_{2,3}$	B_4	L	MV	MR	E_S
σ	1	0.55	0.48	0.42	0.37	0.33	0.41	0.02	0.27	0.08	0.36	0.26	0.23
F		1	0.46	0.37	0.41	0.51	0.01	0.12	0.35	0.52	0.05	0.03	0.38
R			1	0.80	0.80	0.87	0.40	0.22	0.70	0.68	0.38	0.36	0.58
π				1	0.99	0.94	0.83	0.29	0.30	0.21	0.11	0.22	0.85
f					1	0.95	0.79	0.22	0.35	0.25	0.10	0.22	0.80
R_M						1	0.64	0.01	0.56	0.46	0.12	0.01	0.67
B_1							1	0.61	0.11	0.24	0.36	0.56	0.85
$B_{2,3}$								1	0.82	0.81	0.89	0.88	0.59
B_4									1	0.94	0.85	0.77	0.05
L										1	0.80	0.80	0.04
MV											1	0.94	0.36
MR												1	0.42
E_S													1

Tab. 13: Übersicht der Interkorrelationskoeffizienten zwischen den numerischen Werten von Parametern, die für die Regressionsanalyse von Verapamilderivaten der Gruppe I (siehe 7.2.) eingesetzt worden sind. Werte > 0.45 verbieten einen gemeinsamen Einsatz dieser Parameter in Doppelkorrelationen.

Parameter-Kombination	Regressionsgleichung (standardisierte Form)	s	r	F	p
F + f	$0.94(\pm 0.56)F + 0.33(\pm 0.56)f$	0.31	0.86	8.44	<0.05
F + π	$0.94(\pm 0.50)F + 0.39(\pm 0.50)\pi$	0.28	0.88	10.71	<0.05
F + B_1	$0.81(\pm 0.53)F + 0.26(\pm 0.53)B_1$	0.32	0.85	7.55	<0.05
F + $B_{2,3}$	$0.77(\pm 0.53)F + 0.28(\pm 0.53)B_{2,3}$	0.32	0.85	7.81	<0.05
F + B_4	$0.79(\pm 0.63)F + 0.06(\pm 0.63)B_4$	0.35	0.81	5.56	>0.05
F + MV	$0.81(\pm 0.58)F + 0.11(\pm 0.58)MV$	0.35	0.81	5.77	>0.05
F + MR	$0.80(\pm 0.59)F + 0.05(\pm 0.59)MR$	0.35	0.81	5.55	>0.05
F + E_S	$0.96(\pm 0.49)F - 0.41(\pm 0.49)E_S$	0.27	0.89	11.26	<0.05

Tab. 14: Doppelkorrelationen der biologischen Wirkung von Verapamilderivaten aus Gruppe I mit der Feldkonstanten F und jeweils einem zusätzlichen sterischen oder hydrophoben Parameter.

Aufgrund der hier beschriebenen Ergebnisse wurde eine zweite Serie ringvariierter Verapamilderivate untersucht (Gruppe II in 7.2.1.). Die Resultate der biologischen Untersuchungen dieser symmetrisch an beiden Ringen in 3,5-Stellung alkoxylierten Derivate sind in Abschnitt 3.6. ausführlich besprochen worden. Die wesentliche Erkenntnis ist hierbei, daß die für Verapamil typische, frequenzabhängig negativ inotrope Wirkung bei solchen Derivaten nicht mehr zu beobachten ist, deren Substituenten ein bestimmtes Volumen überschreiten.

Aus beiden untersuchten Reihen zeigen 13 Verbindungen eine qualitativ gleichartige Wirkung wie Verapamil und können somit in eine gemeinsame quantitative Struktur-Wirkungsanalyse einbezogen werden.

Einzelkorrelationen der biologischen Wirkung mit den physikochemischen Substituentenparametern zeigen auch für diese Gruppe die herausragende Bedeutung induktiver Effekte für die negativ inotrope Verapamilwirkung an (Ergebnisse siehe auch Tab. 16):

$$\log 1/ED_{50} = 4.33\ (\pm 0.27) + 0.59(\pm 0.47)F \qquad (3.10)$$

$n = 13;\ s = 0.45;\ r = 0.64;\ F = 7.56;\ p < 0.05$

Korreliert man die biologischen Daten mit der Parameter-Kombination aus der Feldkonstanten F und der Molrefraktion MR, dann läßt sich das obige Korrelationsergebnis signifikant verbessern:

$$(\log 1/ED_{50})_{stand.} = 0.93(\pm 0.47)F - 0.59(\pm 0.47)MR \qquad (3.11)$$

$n = 13;\ s = 0.35;\ r = 0.82;\ F = 10.27;\ p < 0.01$

Die Ergebnisse aller durchgeführten Doppelkorrelationen sind in Tabelle 17 zusammengefaßt.

Neben diesen Analysen zu quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen ringvariierter Verapamilderivate sind derartige Untersuchungen auch für Isopropyl-abgewandelte Verapamil-

	σ	F	R	π	f	B_1	$B_{2,3}$	B_4	L	MR
σ	1	0.35	0.48	0.58	0.53	0.05	0.11	0.40	0.42	0.43
F		1	0.64	0.14	0.11	0.49	0.57	0.46	0.53	0.43
R			1	0.27	0.27	0.39	0.50	0.20	0.23	0.15
π				1	0.99	0.28	0.36	0.71	0.71	0.86
f					1	0.29	0.33	0.68	0.68	0.84
B_1						1	0.78	0.22	0.36	0.33
$B_{2,3}$							1	0.64	0.68	0.62
B_4								1	0.96	0.93
L									1	0.91
MR										1

Tab. 15: Übersicht der Interkorrelationskoeffizienten für Parameter, die bei der gemeinsamen Regressionsanalyse von Gruppe I und Gruppe II Verbindungen eingesetzt worden sind.

Parameter	Regressionsgleichung	s	r	F	p
σ	$5.16(\pm 0.34) + 0.40(\pm 0.99)$	0.57	0.26	0.80	>0.05
F	$4.33(\pm 0.27) + 0.59(\pm 0.47)$	0.45	0.64	7.56	<0.05
R	$4.75(\pm 0.34) - 0.44(\pm 0.85)$	0.55	0.33	1.31	>0.05
π	$5.28(\pm 0.34) - 0.13(\pm 0.29)$	0.56	0.28	0.91	>0.05
f	$6.14(\pm 0.34) - 0.15(\pm 0.29)$	0.55	0.33	1.32	>0.05
B_1	$1.83(\pm 0.31) + 0.45(\pm 0.56)$	0.52	0.46	3.02	>0.05
$B_{2,3}$	$3.42(\pm 0.32) + 0.19(\pm 0.28)$	0.53	0.41	2.26	>0.05
B_4	$4.91(\pm 0.32) + 0.02(\pm 0.17)$	0.58	0.08	0.06	>0.05
L	$4.32(\pm 0.35) + 0.04(\pm 0.13)$	0.57	0.23	0.59	>0.05
MR	$5.30(\pm 0.35) - 0.01(\pm 0.02)$	0.58	0.13	0.18	>0.05

Tab. 16: Regressionsanalyse für ringvariierte Verapamilderivate der Gruppen I und II. Die Regressionsgleichungen zeigen, daß sich auch für diese Verbindungen nur mit dem elektronischen Parameter F eine signifikante Korrelation ergibt.

analoge durchgeführt worden (MANNHOLD et al., 1978). Die biologischen Daten und die numerischen Werte der eingesetzten Substituentenparameter sind in Tabelle 18 aufgeführt. Bei einer Derivatezahl von 4 und nur wenigen literaturerhältlichen Parameterwerten lassen die erhaltenen Korrelationsergebnisse (Tab. 19) lediglich den Schluß zu, daß die Varianz in den biologischen Wirkungen dieser Stoffe wahrscheinlich auf hydrophobe Substituenteneffekte zurückzuführen sind.

Parameter-Kombination	Regressionsgleichung	s	r	F	p
F + f	$0.69(\pm0.46)F - 0.41(\pm0.46)f$	0.40	0.76	6.74	<0.05
F + π	$0.70(\pm0.48)F - 0.39(\pm0.48)\pi$	0.41	0.75	6.27	<0.05
F + MR	$0.93(\pm0.47)F - 0.59(\pm0.47)MR$	0.35	0.82	10.27	<0.01

Tab. 17: Regressionsanalyse für Verapamilderivate der Gruppen I und II. Die Doppelkorrelationen zeigen, daß eine Kombination aus elektronischen (F) und sterischen Parametern (MR) die Varianz der biologischen Potenz dieser Verbindung am besten zu erklären vermag.

	Verapamil	D 525	D 490	D 586
π	1.37	1.00	2.69	4.00
π^2	1.88	1.04	7.23	16.00
E_S	-0.47	-0.07	-0.38	-0.33
log 1/C	5.46	5.05	4.72	3.98

Tab. 18: Numerische Werte der Substituentenparameter für Isopropyl-abgewandelte Verapamilderivate: D 490 = Ethyl-, D 525 = Benzyl-, D 586 = n-Octyl-Derivat. Die π-Werte sind aus CRAIG (1971) und die E_S-Werte aus TAFT jr. (1956). Die biologischen Daten (log $1/ED_{50}$) sind in der letzten Zeile aufgeführt.

Parameter	Regressionsgleichung	s	r	F	p
π	$5.80(\pm0.64) - 0.45(\pm0.57)$	0.31	0.92	11.61	<0.05
π^2	$5.38(\pm0.53) - 0.09(\pm0.09)$	0.25	0.95	20.01	<0.02
E_S	$4.70(\pm1.75) - 0.25(\pm11.78)E_S$	0.81	0.06	0.01	>0.05

Tab. 19: Ergebnisse der Regressionsanalyse Isopropyl-variierter Verapamilderivate. Signifikante Korrelationen werden nur mit hydrophoben, aber nicht mit sterischen Parametern erhalten.

7.3. DIE ERGEBNISSE MIT DEM MONOPOL-BINDUNGSPOLARISIERBARKEITSVERFAHREN

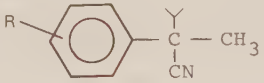
Die bisher vorgestellten Ergebnisse lassen noch einige wesentliche Fragen offen bzw. Teilaspekte der Arzneistoff-Rezeptor-Wechselwirkung unberücksichtigt:

1) Mit Hilfe der HANSCH-Analyse lassen sich keine Erkenntnisse über Arzneistoff-Konformationen gewinnen.
2) Die Frage, ob die Ringsubstituenten direkt durch eigene Rezeptorbindung oder indirekt durch Beeinflussung der elektronischen Eigenschaften des aromatischen Rings die Wirkstärke beeinflussen, konnte ebenfalls mit Hilfe der HANSCH-Analyse nicht geklärt werden.
3) Aussagen über die chemische Struktur des Rezeptormoleküls sind mit diesem Ansatz nur sehr bedingt möglich.

Aus diesem Grunde wurde in Fortführung der bisherigen Arbeiten mit Hilfe rein theoretischer Modellverfahren der Versuch unternommen, eine mögliche sekundäre Bindungsstelle für das Verapamilmolekül vorherzusagen. Strukturbereiche des Rezeptors, die außerhalb des Wechselwirkungsbereichs zwischen Pharmakophor und aktivem Zentrum liegen, nennt man sekundäre, nicht essentielle Bindungsstellen. Wegen der erforderlichen Komplementierung zwischen Pharmakon und Rezeptorstruktur ist die Struktur des Pharmakons innerhalb des Pharmakophor genau definiert. Die Struktur des Pharmakons kann dagegen im sekundären Strukturbereich in bestimmten Grenzen schwanken. Molekülteile des Arzneistoffs, die an nicht essentielle Bereiche von Rezeptoren gebunden werden, haben keinen Einfluß auf die Wirkspezifität, sondern nur auf die Wirkstärke. Durch die auftretenden zusätzlichen Bindungskräfte kann die Lebensdauer des Pharmakon-Rezeptor-Komplexes verlängert und damit die Wirkstärke des Arzneistoffs erhöht werden. Aus diesen Zusammenhängen wird leicht verständlich, daß für die hier interessierenden Molekülstrukturen ein direkter Zusammenhang zwischen der Wirkstärke der entsprechenden Arzneistoffderivate und den berechneten Wechselwirkungsenergien mit Modell-

rezeptorstrukturen bestehen kann. Das Verfahren zur Berechnung der Wechselwirkungsenergien - die Monopol-Bindungspolarisierbarkeitsmethode - ist unter 2.4. ausführlich beschrieben.

Rechnungen dieser Art sind nur auf der Basis exakter Kenntnisse der chemischen Eigenschaften der wechselwirkenden Moleküle möglich, welche vor allem durch quantenchemische Verfahren zugänglich sind: Mit Hilfe der EHT-MO-Methode (erweiterte HÜCKEL-Theorie) werden die bevorzugten (= energieärmsten) Konformationen für die untersuchten Abwandlungsprodukte berechnet. Dabei ist anstelle des gesamten Verapamilmoleküls folgende Teilverbindung als Grundstruktur für die Derivateberechnungen eingesetzt worden:



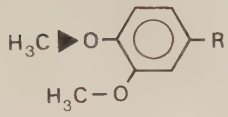
Es konnte davon ausgegangen werden, daß der unveränderte Rest des Gesamtmoleküls in immer identischer räumlicher Anordnung Wechselwirkungen mit anderen Teilbereichen des Gesamtrezeptors eingeht. Ein besonders interessantes Ergebnis der Konformationsanalysen ist die Tatsache, daß unabhängig von der Art der Ringsubstitution der Benzolring und die Nitrilgruppe grundsätzlich koplanar angeordnet sind. Diese Erkenntnis kann für sterische Aspekte der Arzneistoff-Rezeptor-Wechselwirkung von eminenter Bedeutung sein.

Die bevorzugten Konformationen für potentiell nicht planare Ringsubstituenten sind in Abb. 32 aufgeführt. Konformationsanalysen sind essentielle Voraussetzung für Wechselwirkungs-Energieberechnungen[+)], damit anhand von Molekülmodellen die Geometrie des Wechselwirkungs-Modellkomplexes so ausgewählt werden kann, daß keine sterischen Behinderungen der Gesamtmoleküle auftreten können. Darüberhinaus ist die Berechnung der Ladungsdichteverteilung in den wechselwirkenden Molekülen

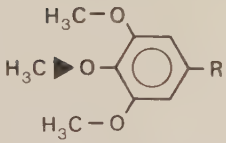
---

[+)] Alle Computerberechnungen zum Monopol-Bindungspolarisierbarkeitsverfahren wurden dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. H.-D. Höltje, Universität Frankfurt/M., durchgeführt.

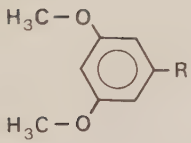
VERAPAMIL



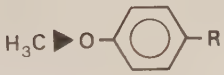
D 600



D 784



D 557



PR 23

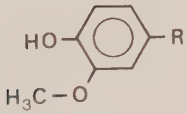
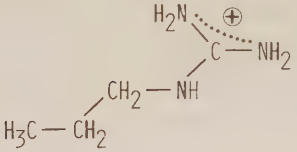


Abb. 32 : Bevorzugte Konformationen der Methoxygruppen in den entsprechend substituierten Derivaten (HÖLTJE, MANNHOLD et al., 1981).

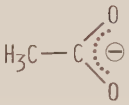
(Arzneistoffderivat und Modellrezeptorstruktur) eine notwendige Eingabegröße für Wechselwirkungsanalysen. Weitere Kenndaten sind die Bindungslängen, Bindungswinkel und Bindungspolarisierbarkeiten, die der Literatur entnommen werden können. Die Berechnung der Ladungsdichteverteilung wird mit Hilfe der quantenchemischen Complete Neglect of Differential Overlap (CNDO/2-MO)-Methode durchgeführt.

Als Modellrezeptorstrukturen (siehe Abb. 33) sind das Acetatanion (Modell für Asparaginsäure), das N-Propylguanidiniumkation (Modell für Arginin) und Toluol (Modell für Phenylalanin) in die Wechselwirkungs-Energieberechnungen eingegangen.

(1) ARGININ: SIMULIERT DURCH N-PROPYLGUANIDINIUM KATION



(2) ASPARAGINAT: SIMULIERT DURCH ACETAT ANION



(3) PHENYLALANIN: SIMULIERT DURCH TOLUOL

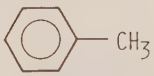
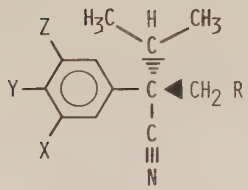


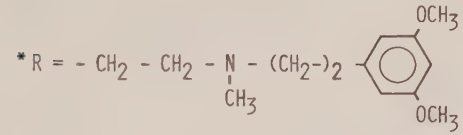
Abb. 33: Formeln der Modellrezeptorstrukturen für Aminosäurebindungsstellen (HÖLTJE, MANNHOLD et al., 1981).

Der Grund für diese Auswahl ist das gehäufte Auftreten der genannten Aminosäuren in dem Ca^{2+}-sensitiven Protein Calmodulin. Dieses Aktivatorprotein gewinnt in den letzten Jahren zunehmend an wissenschaftlichem Interesse, seit bekannt ist, daß die Mehrzahl der "kalziumabhängigen" biologischen Prozesse auf zellulärer Ebene in Wirklichkeit von einem Kalzium-Calmodulin-Komplex reguliert wird. Das Calmodulinmolekül stellt somit einen potentiellen Angriffsort zur Inhibition kalziumvermittelter Prozesse dar.

In die Wechselwirkungs-Energieberechnungen mit den oben genannten Aminosäuremodellen sind die Verapamilderivate eingegangen, deren Substitutionsmuster in Abb. 34 wiedergegeben ist.



Verbindung	Substituent		
	X	Y	Z
Verapamil	OCH_3	OCH_3	H
D 600	OCH_3	OCH_3	OCH_3
D 784*	OCH_3	H	OCH_3
D 557	H	OCH_3	H
PR 23	OCH_3	OH	H
D 595	Cl	Cl	H
T 13	CF_3	H	H
Sz 48	H	F	H
D 559	CH_3	CH_3	H
Sz 45**	H	H	H



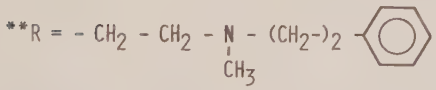


Abb. 34: Substitutionsmuster der für Wechselwirkungs-Energieberechnungen eingesetzten Verapamil-derivate (HÖLTJE, MANNHOLD et al., 1981).

Tabelle 19 faßt die ermittelten Wechselwirkungs-Energien für die drei Aminosäuremodelle bei einem Abstand zwischen den reagierenden Molekülоberflächen von 4, 4.25 bzw. 4.5 Å zusammen:

Verbindung	Negativ inotroper Effekt (log $1/EC_{50}$)	Berechnete Wechselwirkungsenergien (WWE) für verschiedene Abstände zw. den reagierenden Oberflächen (Å)								
		ARGININ			PHENYLALANIN			ASPARAGINSÄURE		
		4.5	4.25	4.0	4.5	4.25	4.0	5.0	4.5	4.0
D 595	6.1	4.97	6.11	7.53	3.73	4.51	5.24	1.47	1.70	1.53
D 600	5.91	4.74	5.74	6.96	2.88	3.41	3.86	1.51	1.80	1.87
D 784	5.70	4.46	5.42	6.59	2.32	2.32	3.35	1.40	1.67	1.74
T 13	5.59	4.25	5.12	6.11	3.12	3.46	3.28	1.30	1.18	1.34
VERAPAMIL	5.46	4.16	5.05	6.13	2.70	3.20	3.60	1.29	1.59	1.53
Sz 48	5.18	4.20	5.17	6.39	2.40	2.83	3.15	1.10	1.29	1.27
D 559	5.09	3.89	4.74	5.79	3.48	4.10	4.49	1.44	1.58	0.88
PR 23	4.97	3.94	4.78	5.82	2.79	3.11	3.50	1.33	1.56	1.54
D 557	4.80	3.78	4.57	5.55	2.62	3.32	3.77	1.29	1.53	1.56
Sz 45	4.40	3.24	3.93	4.77	2.53	3.00	3.39	1.19	1.41	1.44

Tab. 19: Berechnete Wechselwirkungsenergien (kcal/mol) für die Wechselwirkung der eingesetzten Verapamilderivate mit Modellrezeptorstrukturen für die Aminosäurebindungsstellen Arginin, Phenylalanin und Asparaginsäure. Es sind die Werte für 3 verschiedene Abstände zwischen den reagierenden Oberflächen aufgeführt.

Mit Hilfe der Regressionsanalyse läßt sich der korrelative Zusammenhang zwischen den errechneten Wechselwirkungs-Energien zum jeweiligen Rezeptormodell einerseits und der negativ inotropen Wirkstärke der Untersuchungssubstanzen andererseits quantitativ ermitteln. Derartige Analysen ergeben weder für das Asparaginsäuremodell (r = 0.344) noch für das Phenylalaninmodell (r = 0.398) signifikante Beziehungen. Für das Argininmodell ergibt sich bei einem Abstand von 4.25 Å zwischen den reagierenden Oberflächen ein Korrelationskoeffizient von 0.691. Eine Analyse der Einzelergebnisse zeigt, daß insbesondere der Wert der Wechselwirkungs-Energie für das para-Fluorderivat Sz 48 erheblich niedriger liegt, als es der negativ inotropen Potenz dieser Substanz entspräche. Auf Grund der chemischen Eigenschaften von Fluorsubstituenten ist die Annahme berechtigt, daß das Fluoratom im Wechselwirkungs-Komplex seine Hydrathülle nicht vollständig abstreift, sondern als Monohydrat vorliegt. Für diese Bedingungen ergibt die Wechselwirkungs-Energieberechnung einen entsprechend höheren Wert und der Korrelationskoeffizient für die Beziehung zwischen Wechselwirkungs-Energie und negativ inotroper Wirkung beträgt 0.972. Die entsprechende Regressionsgleichung ist in Abb. 35 graphisch dargestellt:

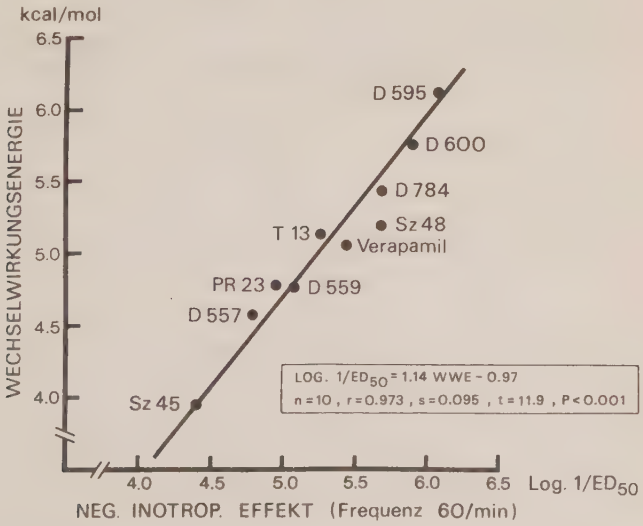


Abb. 35: Korrelation der negativ inotropen Wirkung der Untersuchungssubstanzen für die Reizfrequenz 60/min mit der Wechselwirkungsenergie dieser Verbindungen zur Modellrezeptorstruktur Arginin (HÖLTJE, MANNHOLD et al., 1981).

Diese Ergebnisse besagen, daß die Varianz der negativ inotropen Wirkung ringvariierter Verapamilderivate zu 95% anhand der Wechselwirkungs-Energie der entsprechenden Substituenten mit der potentiellen sekundären Bindungsstelle Arginin erklärt werden kann. Die Geometrie der Wechselwirkungs-Komplexe ist für die Verbindungen Verapamil und "Monohydro"-Sz 48 in den Abb. 36 und 37 wiedergegeben.

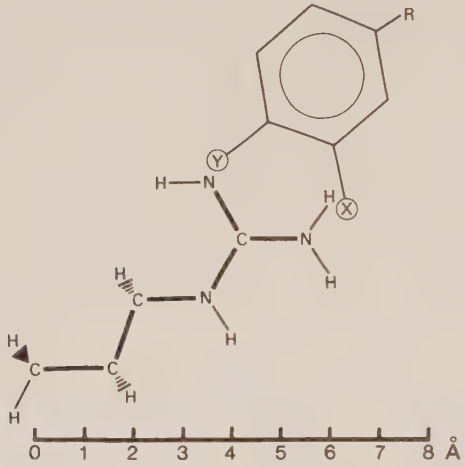


Abb. 36: Geometrie des Arginin-Verapamil-Wechselwirkungskomplexes (HÖLTJE, MANNHOLD et al., 1981).

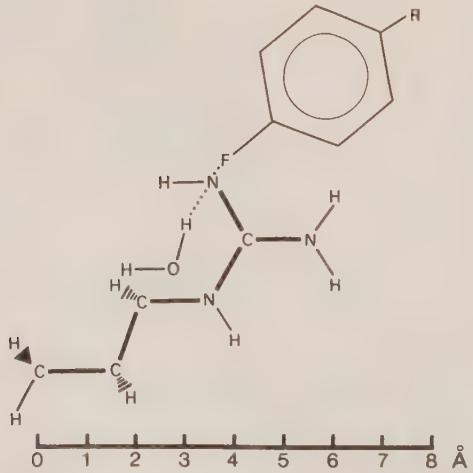


Abb. 37: Geometrie des Arginin-Sz 48 · H_2O-Wechselwirkungskomplexes (HÖLTJE, MANNHOLD et al., 1981).

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Untersuchungsergebnisse ermöglichen die folgenden neuen Erkenntnisse zur Struktur-Wirkungsbeziehung von Verapamil:

1) Quantenchemische Konformationsberechnungen mit Hilfe des EHT-MO-Verfahrens haben ergeben, daß unabhängig von Art und Stellung der Substituenten der linke aromatische Ring und die Nitrilgruppe koplanar angeordnet sind.
2) Die Analyse der Wechselwirkungs-Energien anhand des Monopol-Bindungspolarisierbarkeitsmodells führt zu der Erkenntnis, daß die Substituenten einen größeren Beitrag zur Rezeptorbindung und damit zur Wirkstärke leisten als der Benzolring.
3) Die chemischen Bedingungen für eine sekundäre Bindungsstelle des Verapamilaromaten werden in hervorragender Weise durch die Aminosäure Arginin erfüllt.

4. D I S K U S S I O N

4.1. DIE WIRKQUALITÄT

Fast alle Ca-Antagonisten wirken in vitro negativ inotrop, das heißt sie vermindern die Kraftentwicklung bzw. die maximale Kraftanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}) des isolierten Myokards. Dies bedeutet nicht, daß die Pumpleistung eines (nicht insuffizienten) Herzens in situ durch diese Stoffe notwendigerweise vermindert wird. Tatsächlich findet sich unter der Wirkung Ca-antagonistischer Substanzen üblicherweise auch keine Verschlechterung der hämodynamischen und muskelmechanischen Kenngrößen für die Pumpfunktion des Herzens (HZV, Füllungsdruck, dp/dt/P). Dies läßt sich ganz einfach so verstehen, daß - trotz Verminderung der Myokardkontraktilität auf zellulärer Ebene - die verminderte Nachbelastung und autoregulative Prozesse (Sympathikusaktivierung, Frank-Starling) die Herzleistung weiterhin an die jeweiligen Bedürfnisse des Kreislaufs anpassen.

Dennoch kann uns die Untersuchung der kardialen Wirkmuster am isolierten Myokardpräparat nicht nur wertvolle Hinweise zum molekularen Wirkmechanismus einer Ca-antagonistischen Substanz liefern, sondern auch Ergebnisse von klinisch therapeutischem Interesse erzielen.
Zur Charakterisierung der inotropen Wirkung eines Pharmakons und zu einer Abgrenzung von anderen inotrop wirksamen Substanzen reicht die Messung der isotonen oder isometrischen Kontraktionsamplitude bei einer gegebenen Reizfrequenz nicht aus. Vielmehr ist es in jedem Fall zunächst erforderlich, die Frequenzabhängigkeit der inotropen Wirkung unter Kontrollbedingungen und nach Pharmakoneinwirkung zu ermitteln (Amplituden-Frequenzbeziehung = AFB). Wir haben derartige Untersuchungen für eine Vielzahl negativ inotroper Pharmaka am isoton kontrahierenden Katzenpapillarmuskel durchgeführt. Anhand ihrer Beeinflussung der AFB kann man die Kalziumantagonisten und verwandte negativ inotrope Pharmaka in drei

Gruppen mit qualitativ unterschiedlicher Wirkung einteilen:

I) Verbindungen, die vorzugsweise bei hohen Reizfrequenzen wirken wie z.B. Verapamil, Tiapamil und Fendilin (→ Umkehr der AFB),

II) Verbindungen, die weitgehend frequenzunabhängig negativ inotrop wirken wie Nifedipin und Prenylamin (→ Prallelverschiebung der AFB), und

III) Verbindungen, die insbesondere bei niedrigen Reizfrequenzen wirken wie z.B. Bepridil, Bencyclan, Aprindin und Mebeverin (→ Betonung der AFB).

Die hier vorgenommene Einteilung berücksichtigt allerdings nur die Amplituden-Frequenzbeziehung im Gleichgewicht. Betrachtet man zusätzlich die Treppenphänomene, die bei plötzlichem Frequenzwechsel auftreten, dann sind auch innerhalb der einzelnen Gruppen Unterschiede festzustellen. So kommt es unter Verapamil zu kurzen negativen Treppen und einem darauffolgenden langsamen Wiederanstieg der Kontraktionsamplituden (biphasische Treppen). Die ebenfalls in Gruppe I eingereihten Pharmaka Tiapamil und Fendilin bewirken dagegen lediglich monophasische Übergänge, die nach kurzer Zeit neue Gleichgewichtswerte erreichen.

Pharmaka aus Gruppe III lassen die Treppenphänomene nach Frequenzwechsel nahezu unbeeinflußt. Eine Ausnahme macht hier die Verbindung Aprindin, die langanhaltende transitorische Treppen von bis zu 240 Schlägen hervorruft. Über die angeführten qualitativen Unterschiede hinaus sind auch ausgeprägte Unterschiede in der Wirkstärke der Pharmaka zu beobachten. Die wirksamste Verbindung, Verapamil, ist etwa 100mal stärker negativ inotrop wirksam als Tiapamil. Für die jeweiligen Reizfrequenzen ergeben sich außerdem unterschiedliche Reihenfolgen in der Wirksamkeit der Untersuchungssubstanzen. So sind Verapamil und Aprindin bei der Reizfrequenz 6/min nahezu äquieffektiv, während Verapamil bei der Reizfrequenz 60/min etwa 20mal stärker wirksam ist als Aprindin.

Die Vielfalt der hier beschriebenen inotropen Effekte, die durch Ca-antagonistische Wirkstoffe am Myokard hervorgerufen werden, ist nur so zu interpretieren, daß diese Substanzen verschiedenartige membranäre und zum Teil auch intrazelluläre Angriffspunkte im Bereich der sogenannten elektromechanischen Koppelung besitzen.
Mit Hilfe der Spannungsklemmen-Methode ließ sich beweisen, daß Kalziumantagonisten nicht nur in unterschiedlicher Weise in die Kontrollparameter der membranären Ca-Leitfähigkeit eingreifen können, sondern darüberhinaus z.T. auch noch Wirkungen auf andere Ionenströme ausüben. Im Hinblick auf den Ca-Einwärtsstrom haben voltage clamp Experimente mit Verapamil und D 600 z.B. eindeutig belegt, daß diese Substanzen vor allem die Erholung des langsamen Membrankanals nach Ablauf einer Aktivierung verzögern (KOHLHARDT et al., 1972; EHARA und KAUFMANN, 1978). Dies bedeutet, daß mit Zunahme der Reizfrequenz nicht alle Membrankanäle für eine erneute Aktivierung zur Verfügung stehen und damit die Gesamtmenge des transmembranären Kalziumeinstroms geringer wird. Da die Füllung der intrazellulären Kalziumspeicher im mittleren Zeitintegral von dem transmembranären Einwärtsstrom bestimmt wird, steht unter der Einwirkung von "Recoveryhemmern" bei höheren Reizfrequenzen weniger Aktivatorkalzium aus den intrazellulären Speichern zur Verfügung. Dies macht zumindest die Umkehr der Amplituden-Frequenzbeziehung unter Verapamil verständlich. Inotrope Eigenschaften wie die Verlangsamung der biphasischen Treppen nach Frequenzwechsel sowie die Verlangsamung der Restitutionskinetik intrazellulären Speicherkalziums konnten auf dieser Basis jedoch nicht ohne weiteres erklärt werden. Es zeigt sich nun, daß dies leicht möglich ist, wenn man nicht nur eine Hemmung der transmembranären Kalziumversorgung, sondern auch eine Verlangsamung der Kalziumtranslokation innerhalb des sarkoplasmatischen Retikulums annimmt.

Weitere Deutungsmöglichkeiten für den molekularen Wirkungsmechanismus von Verapamil ergeben sich aus der Tatsache, daß die Wirkstärke dieser Substanz eine Funktion des Membranpotentials ist (EHARA und KAUFMANN, 1978; McDONALD et al., 1980; LINDEN und BROOKER, 1980). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde in Analogie zur Wirkung verschiedener Lokalanaesthetika versucht, die Verapamilwirkung mit Hilfe der sogenannten use dependence zu erklären (McDONALD et al., 1980; RODENKIRCHEN et al., 1980). Nach diesen Vorstellungen soll die Depolarisation die Anlagerung der Substanz an den membranären Bindungspartner erleichtern, während Hyperpolarisation die Dissoziation begünstigt. Da hohe Reizfrequenzen die Depolarisationsdauer im Vergleich zur Repolarisationsdauer begünstigen, könnte die längere Verweildauer des Wirkstoffs am Rezeptor bei hohen Reizfrequenzen die Grundlage der frequenzspezifischen Wirkung von Verapamil darstellen.

Neben Verapamil sind nach unseren Untersuchungen Tiapamil und Fendilin Kalziumantagonisten mit bevorzugter Wirkung bei hohen Reizfrequenzen. Tiapamil führt erst bei 100mal höheren Dosen als Verapamil zu einer Umkehr der Amplituden-Frequenzbeziehung bei Fehlen der für Verapamil typischen biphasischen Treppen. Wie Verapamil verlangsamt auch Tiapamil die Restitutionskinetik des im SR aufgenommenen Kalziums. Allerdings sind hier auch noch nach langen Pausen die Amplituden der Testkontraktionen vermindert; dies spricht dafür, daß unter Tiapamil die im SR gespeicherte Kalziummenge insgesamt geringer ist. Die ausgesprochen schwache negativ inotrope Wirkung des vom Verapamilmolekül abgeleiteten Tiapamil wird aufgrund unserer Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen von Verapamil leicht verständlich. Das Verapamilmolekül ist genau an den Strukturen in der Nähe des asymmetrischen Kohlenstoffs abgewandelt worden, die für die Wirkstärke entscheidend sind.

Für den dritten Vertreter dieser Gruppe, Fendilin, liegen bis heute keine überzeugenden Interpretationen zur Erklärung des frequenzspezifischen Effektes vor.

Als frequenzunabhängig negativ inotrope Verbindung zeigte sich unter den Untersuchungssubstanzen der vorliegenden Arbeit nur das Prenylamin. Diese Zuordnung resultiert aus der prozentualen Form der Auswertung des negativ inotropen Effektes. In absoluten Werten (%L_i oder p/cm^2) ist eine Verbindung, die bei allen Reizfrequenzen die Kontraktionsamplitude z.B. um 50% senkt, bei hohen Reizfolgen wirksamer als bei niedrigen. Man könnte Prenylamin daher auch in die Gruppe der Kalziumantagonisten einreihen, die stärker bei höheren Reizfrequenzen wirken (wie z.B. Verapamil). Prenylamin ist neben Verapamil und Nifedipin eine der drei Verbindungen, für die eine Hemmung des potentialabhängigen transmembranären Ca^{2+}-Einwärtsstroms durch Spannungsklemmen-Analyse nachgewiesen ist (HAAS et al., 1975). Die Zuordnung dieser Substanzen in eine gemeinsame Untergruppe kalziumantagonistischer Verbindungen erscheint daher auch aus diesen Gründen sinnvoll.

Die qualitative Auswertung der negativ inotropen Wirkung der Untersuchungssubstanzen ergab eine dritte Gruppe von Pharmaka, die bevorzugt bei niedrigen Reizfolgen wirken. Sie reduzieren die Kontraktionsamplituden bei allen hier untersuchten Reizfrequenzen um den gleichen Absolutbetrag (%L_i oder p/cm^2). Damit wird deutlich, daß der Effekt bei niedriger Reizfrequenz mit vergleichsweise niedrigen Kontraktionsamplituden besonders prominent ist. Hierzu gehören Bepridil, Bencyclan, Mebeverin, Dilazep, Hexobendin und Aprindin. Bis auf Aprindin lassen die genannten Substanzen die transitorischen Übergänge nach Frequenzwechsel nahezu unbeeinflußt.
Alle Pharmaka dieser Gruppe wirken erst in relativ hohen Dosen negativ inotrop. Nicht rezeptorvermittelte, strukturunspezifische Membranwechselwirkungen stellen in vielen Fällen die molekulare Grundlage solcher Pharmakoneffekte dar. Strukturunspezifische Wirkstoffe sind gegen Molekülvariationen vergleichsweise unempfindlich. Methylquaternisierte Abwandlungsprodukte von Aprindin, Dilazep und Hexobendin weisen trotz dieses ausgeprägten chemischen Eingriffs noch eine Restwir-

kung von 20 bis 30% im Vergleich zu den nicht quaternisierten Ausgangsverbindungen auf. Diese Befunde stützen die Hypothese einer strukturunspezifischen Wirkung.
Eine elektrophysiologische Deutung der oben beschriebenen inotropen Eigenschaften läßt sich aus Experimenten von BAYER et al. (1977) mit Diphenylhydantoin ableiten. Normalerweise wird eine Senkung der Reizfrequenz von einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer begleitet. Der Kalziumeinstrom pro Schlag wird dadurch erhöht und die frequenzabhängig verminderte zeitintegrierende Kalziumversorgung autoregulativ kompensiert. Wird - wie unter der Einwirkung von Diphenylhydantoin - die Frequenzabhängigkeit der Aktionspotentialdauer aufgehoben, dann muß dies in einer entsprechenden Versteilerung der Amplituden-Frequenzbeziehung resultieren. Für die hier untersuchten Substanzen liegen bisher keine elektrophysiologischen Untersuchungen vor; die analogen inotropen Eigenschaften könnten aber auf ähnliche elektrophysiologische Grundmechanismen der Untersuchungssubstanzen aus Gruppe III hindeuten.

Die bisher diskutierten Eigenschaften negativ inotroper Pharmaka lassen die folgende Zweiteilung erkennen:

1) Strukturspezifische Pharmaka, die in relativ geringen Konzentrationen vor allem bei hohen Reizfrequenzen negativ inotrop wirken (z.B. Verapamil, Prenylamin, Fendilin), und
2) strukturunspezifische Pharmaka, die in relativ hohen Konzentrationen vor allem bei niedrigen Reizfrequenzen negativ inotrop wirken (z.B. Mebeverin, Dilazep, Hexobendin, Aprindin).

Ein wesentlicher experimenteller Hinweis, die Substanzen Verapamil, Prenylamin und Fendilin als strukturspezifische Pharmaka zu klassifizieren, ergibt sich aus unseren Untersuchungen mit den entsprechenden Enantiomeren dieser Arzneistoffe. Für die genannten Verbindungen konnte gezeigt werden, daß die negativ inotrope Wirkung stereoselektiv und dem links-

drehenden Isomeren zuzuordnen ist. Wirkunterschiede zwischen Enantiomeren, die ja in ihren wesentlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften völlig identisch sind, lassen sich nur über die Beteiligung biologischer Wechselwirkungspartner an der Auslösung des pharmakologischen Effektes erklären (LEHMANN et al., 1975).

Im Zusammenhang mit der pharmakologisch relevanten Frage der Organselektivität sind in jüngster Zeit hochinteressante Arbeiten zur glattmuskulären Wirkung kalziumantagonistischer Pharmaka erschienen (Van MEEL et al., 1981). Diese Autoren konnten zeigen, daß z.B. Azepexol-induzierte Arteriolenkontraktionen durch verschiedene Kalziumantagonisten nicht-kompetitiv gehemmt werden konnten. Van MEEL und Mitarbeiter deuten diese Befunde wie folgt: Die über postsynaptische α_2-Rezeptoren vermittelte Vasokonstriktion bedarf des Einstroms extrazellulären Kalziums. Die Hemmung dieses Einstroms durch Kalziumantagonisten resultiert in einer verminderten Sensitivität der Widerstandsgefäße für zirkulierendes Noradrenalin. Diese Zusammenhänge könnten zumindest teilweise die mechanische Grundlage der antihypertensiven Wirksamkeit von Kalziumantagonisten darstellen.

Mit diesen Befunden sind interessante Ansätze für die spezifische Entwicklung organselektiver Kalziumantagonisten gegeben.

4.2. DER WIRKORT

Die molekularen Wirkorte kalziumantagonistischer Pharmaka sind im Bereich der Kanalstrukturen von Herz- und Gefäßmuskelzellmembranen lokalisiert. Auch Kalziumantagonisten gehören somit zu der großen Zahl von Arzneistoffen, deren pharmakologische Effekte auf der Wechselwirkung mit Membranen basieren. Membranen setzen sich aus Proteinen und Lipiden zusammen, die je nach Membrantyp in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen auftreten. Ein geringerer Anteil an Kohlenhydraten kann kovalent an die Proteine und Lipide gebunden sein. Das Flüssig-Mosaik Modell von SINGER und NICOLSON (1972) beschreibt die heute allgemein akzeptierten Vorstellungen zur Membranstruktur. Die Lipide ordnen sich in Doppelschichten an, wobei die hydrophilen Gruppen die beiden Oberflächen und die Kohlenwasserstoffketten eine hydrophobe innere Phase bilden. Bei den Proteinen unterscheidet man integrale Anteile mit amphiphiler Struktur, die im hydrophoben Inneren der Doppelschicht über hydrophobe Wechselwirkungen mit den Kohlenwasserstoffketten der Lipide verankert sind, von mehr oberflächlich lokalisierten peripheren Proteinen, die einen großen Anteil hydrophiler Strukturen aufweisen. Struktur und Aufbau der Membranbestandteile bringen es mit sich, daß die beiden Membranoberflächen unterschiedlich zusammengesetzt sind (→Membranasymmetrie). Aus dieser Tatsache erklärt sich die pharmakologische Erkenntnis, daß viele membranwirksame Pharmaka selektiv an der Membranaußen- oder innenseite wirken (ULBRICHT, 1974). Während die Lipiddoppelschicht hauptsächlich als Permeabilitätsbarriere anzusehen ist, werden die spezifischen Membranfunktionen (Transportsysteme, Energiewandler und Rezeptoren) im wesentlichen durch die Membranproteine bestimmt. Rezeptoren sind arzneistoffkomplementäre Zellbestandteile, mit denen strukturspezifische Pharmaka Wechselwirkungen eingehen. Diese Wechselwirkungen stellen die molekulare Grundlage des biologischen Effektes dar. Charakteristische Rezeptoreigenschaften sind ihre Sensibilität (niedrige Arzneistoffkonzentrationen lösen ausgeprägte biologische Effekte aus), ihre Selektivität (nur chemisch eng verwandte Pharmaka können die gleiche biologische Antwort am Rezeptor auslösen) und ihre

Spezifität (die Aktivierung eines Rezeptors führt zu einer exakt definierten und identisch reproduzierbaren biologischen Antwort).
Es existiert eine Vielzahl von Rezeptortheorien, die die Arzneistoff-Rezeptorwechselwirkung mit dem Meßeffekt rational zu verknüpfen suchen. Nach der sogenannten Okkupationstheorie (CLARK, 1927; GADDUM, 1937) korreliert der Meßeffekt direkt mit der Anzahl besetzter Rezeptoren; der maximale Effekt wird demnach bei Besetzung aller Rezeptoren erreicht. Im Gegensatz zur Okkupationstheorie versucht die Geschwindigkeitstheorie von PATON (1961) das Ausmaß des Meßeffekts mit der Zerfallsgeschwindigkeit des Arzneistoff-Rezeptorkomplexes zu erklären.

Die genannten Zusammenhänge machen offensichtlich, daß für die Untersuchungssubstanzen der vorliegenden Arbeit bei ihrer chemischen Heterogenität sowohl unterschiedliche Wirkungsmechanismen als auch unterschiedliche Wirkorte anzunehmen sind. Die primären Wirkorte der in dieser Arbeit untersuchten herz- und gefäßaktiven Kalziumantagonisten sind in den Ca^{2+}-Kanalstrukturen zu suchen, die in den Membranen der Erfolgsorgane lokalisiert sind. Dabei ist ein wesentlicher Unterschied zwischen Herz- und Gefäßmuskulatur zu nennen, dessen genaue Analyse eine rationale Basis für die Entwicklung organspezifischer Kalziumantagonisten darstellen könnte. Während die Herzmuskelzellmembran nur potentialabhängige Kalziumkanäle aufweist, sind am Gefäßmuskel darüberhinaus potentialunabhängige, sogenannte rezeptor-operierte Kanäle nachgewiesen. Ihre Organverteilung sowie der Beitrag zur Bereitstellung kontraktionswirksamen Kalziums sind noch nicht hinreichend untersucht, um heute schon die Verwertbarkeit dieser qualitativen Unterschiede für die rationale Entwicklung organselektiver Kalziumantagonisten abschließend beurteilen zu können. Über die hier angesprochenen organbedingten Wirkortunterschiede hinaus sind auch für den potentialabhängigen Kalziumkanal verschiedene Angriffspunkte möglich, indem Pharmaka selektiv in die verschiedenen Steuerungsprozesse dieses Kanals eingreifen können.Diese durch Spannungsklemmenanalyse nachgewiesenen differenten Wirkmechanismen bedingen auch unterschiedliche Wirkorte, da die zugrundeliegenden Molekül-

strukturen an der Membranaußenseite (Aktivierungsstrukturen) bzw. an der Membraninnenseite (Inaktivierungsstrukturen) nachgewiesen werden konnten. Zur membranären Wirkortbestimmung kalziumantagonistischer Pharmaka liegt heute eine Reihe, zum Teil widersprüchlicher Befunde vor. Intensive Untersuchungen sind hier insbesondere für Verapamil, den klinisch wichtigsten Kalziumantagonisten durchgeführt worden. Eine Vielzahl unterschiedlichster experimenteller Ansätze wird hierbei zur Klärung der Wirkortfrage herangezogen. Ein entscheidender Punkt ist in diesem Zusammenhang die Arzneistofflipophilie. Um intrazelluläre bzw. an der Membraninnenseite gelegene Wirkorte erreichen zu können, muß ein Pharmakon die hydrophobe Lipidbarriere der Membran durchdringen können. Nach unseren Untersuchungen stellen die Kalziumantagonisten unter den wichtigsten herzaktiven Pharmaka die Substanzklasse mit den ausgeprägtesten lipophilen Eigenschaften dar. Die Voraussetzungen für eine leichte Membranpassage dieser Verbindungen sind damit erfüllt.

Weitere Hinweise auf einen intrazellulären Wirkort ergeben sich aus den Experimenten mit Quaternisierungsprodukten von Kalziumantagonisten. Quaternisierungsprodukte sind als Permanentionen nicht in der Lage, Membranen zu durchdringen. Das vollständige Ausbleiben einer negativ inotropen Wirkung bei quaternisiertem Verapamil ist daher als direktes Indiz für einen intrazellulären bzw. an der Innenseite des Plasmalemms gelegenen Wirkort von Verapamil zu interpretieren.

Interessante Analogieschlüsse lassen sich aus einem Vergleich der molekularen Wirkungen des Kalziumantagonisten Verapamil mit dem Natriumantagonisten Lidocain ableiten. Beide Arzneistoffe beeinflussen die Kontrollparameter der jeweiligen Membranleitfähigkeit in gleicher Weise, indem sie z.B. zu einer ausgeprägten Verlangsamung der Erholung von der Inaktivierung führen. Darüberhinaus gilt für beide Pharmaka eine ausgesprochene Frequenzabhängigkeit ihrer Wirkung. Für Lidocain konnte durch die Untersuchungen von STRICHARTZ (1973) ein intrazellulärer Wirkort von Lidocain eindeutig belegt werden. Auch hieraus lassen sich Hinweise für den potentiellen Wirkort von Verapamil ableiten. Wesentliche experimentelle Bestätigung haben diese theoretischen Überlegungen durch unsere

Untersuchungen zur zellulären Lokalisation von Verapamil mit Hilfe der LAMMA-Analyse erfahren. Die Auswertung der zellulären Verteilung der verapamilanalogen Verbindung T 13 in gefriergetrockneten Katzenpapillarmuskeln hat eine ausgeprägte Anreicherung dieser Verbindung im Intrazellulärraum ergeben. Nach unseren Untersuchungen ist eine zehnfache intrazelluläre Anreicherung im Vergleich zum Extrazellulärraum gegeben. In ihrer Gesamtheit besagen alle aufgeführten Untersuchungen, daß Verapamil auf Grund seiner ausgeprägten Lipophilie als freie Base in den Intrazellulärraum eindringt und dort in protonierter Form an seinen Wechselwirkungspartner bindet. Auch die Befunde von TRIGGLE (1980) stehen hiermit in Einklang. Nach seinen Untersuchungen wirkt Methoxyverapamil am glatten Muskel bei alkalischem pH stärker. Unter diesen Bedingungen ist der Anteil an freier Base größer, so daß die Membranpassage und damit das Erreichen des Wirkorts erleichtert sind.
Untersuchungen zur chemischen Zusammensetzung des cardialen Bindungspartners von Verapamil sind bisher nur in geringem Umfang durchgeführt worden. MAS-OLIVA und NAYLER (1980) konnten eine Bindung von Verapamil an isolierte Sarkolemmpraeparationen nachweisen. Nach Neuraminidasebehandlung solcher Praeparationen nimmt die Bindungskapazität zu, nach Trypsin-, Phospholipase C- oder Acetylglucosaminidasebehandlung nimmt sie ab. Die Autoren schließen aus diesen Ergebnissen auf Glykoproteine oder Glykolipide als Bindungspartner für Verapamil. Von besonderer Wichtigkeit sind hierbei die Auswirkungen der Neuraminidasebehandlung. Dieses Enzym baut spezifisch die Sialinsäurebestandteile der Membranpraeparationen ab. Gerade die Sialinsäurereste sind aber mit einiger Sicherheit für die Regulation der Permeabilität der Herzmuskelzellmembran für Kalzium entscheidend. Die oben erwähnten Bindungsexperimente widerlegen die in der Literatur verbreitete Behauptung, daß Kalziumantagonisten mit Kalzium im Sinne einer klassischen Kompetition um gemeinsame Bindungsstellen konkurrieren.
Mit Hilfe des Monopol-Bindungspolarisierbarkeitsverfahrens konnte überzeugend bestätigt werden, daß der Bindungspartner des Verapamil höchstwahrscheinlich Proteincharakter besitzt.

Dies zeigt die hochsignifikante Korrelation zwischen der negativ inotropen Wirkung ringvariierter Verapamilderivate und ihrer Wechselwirkungsenergie zu der Aminosäure Arginin an. Die bisher beschriebenen Untersuchungen zum Wirkort von Kalziumantagonisten beziehen sich alle auf Wirkungen an Kanalstrukturen, die Kalziumbewegungen kontrollieren. FAIRHURST und Mitarbeiter (1980) zeigten, daß Kalziumantagonisten keineswegs selektiv auf Kalziumkanäle wirken. In Konzentrationen, die dem halbmaximalen negativ inotropen Effekt am Katzenpapillarmuskel entsprechen, bindet zum Beispiel Methoxyverapamil an muskarinische und α-Rezeptoren in Rattenhirnpraeparationen. Interessanterweise ordnen diese Autoren die genannten Wirkungen der freien Arzneistoffbase zu, während unsere Untersuchungen die protonierte Base als die Wirkform bei kalziumantagonistischen Effekten erkennen lassen.

Außer den bisher diskutierten sarkolemmalen Bindungsstellen rücken auf Grund biochemischer Erkenntnisse der jüngsten Zeit weitere potentielle Bindungspartner für Kalziumantagonisten in den Vordergrund des Interesses. Es gilt inzwischen als gesichert, daß die Mehrheit der kalziumabhängigen zellulären Prozesse nicht durch ionisiertes freies Kalzium, sondern durch einen Kalzium-Proteinkomplex reguliert wird. Dieses ubiquitäre Regulatorprotein heißt Calmodulin (Übersichtsarbeit siehe MEANS und DEDMAN, 1980); es hat ein Molekulargewicht von 17000 und weist vier Bindungsstellen für Kalzium auf. Calmodulin ist aus 148 Aminosäuren mit einem besonders hohen Anteil an Asparagin- und Glutaminsäure sowie Lysin und Arginin aufgebaut. Zu den Kalzium-Calmodulin regulierten Systemen gehören die Adenylat- und Guanylatzyklase, die Ca^{2+}- ATPase und die Myosin Light Chain-Kinase (MLCK). Gerade im Zusammenhang mit Kalziumantagonisten ist das letztgenannte Enzym besonders interessant. Die heutigen Vorstellungen zur Aktivierung dieses Enzyms im glatten Gefäßmuskel sind dabei wie folgt: Im relaxierten Muskel liegt das Calmodulin im isolierten, kalziumfreien Zustand vor. Bei der Muskelerregung und der damit verbundenen Steigerung der intrazellulären Kalziumkonzentration bildet sich der Kalzium-Calmodulin Komplex, der

wiederum die MLCK aktiviert. Die MLCK-Aktivierung führt zur Phosphorylierung der leichten Myosinketten. Der Phosphorylierungsgrad der leichten Myosinketten korreliert mit der ATPase-aktivität von Aktomyosin. Aus diesen Zusammenhängen wird unmittelbar ersichtlich, daß die Hemmung des Regulatorproteins einen Eingriff in den Kontraktionszustand des glatten Gefäßmuskels erlaubt. Für die als Kalziumantagonist eingestufte Substanz Diazoxid ist ein solcher Calmodulinantagonismus inzwischen nachgewiesen (SCHULTZ, persönliche Mitteilung). Es wird weiterer Untersuchungen bedürfen, um die Bedeutung von Calmodulin als einem der potentiellen Rezeptoren für kalziumantagonistische Pharmaka abschließend zu klären.

DIE WIRKFORM

Die Dissoziationskonstante K_a bzw. ihr negativ dekadischer Logarithmus pK_a ist neben dem Lipoid-Wasser-Verteilungsverhalten eine entscheidende physikochemische Determinante der molekularpharmakologischen Eigenschaften vieler Pharmaka. Resorption und Verteilung sowie die Rezeptor-Wechselwirkungen dissoziabler Wirkstoffe sind in vielen Fällen eng mit dem pK_a-Wert korreliert (SEYDEL et al., 1976; TRETTIN, 1977). Die Bedeutung des pK_a-Wertes für das kinetische und dynamische Verhalten von Arzneistoffen wird durch folgende Beispiele belegt: Bei gegebenem physiologischen Körper-pH-Wert bestimmt der pK_a-Wert das jeweilige Ausmaß an dissoziiertem bzw. undissoziiertem Arzneistoff und entscheidet damit dessen Fähigkeit, in ausreichendem Maße Membranen zu permeieren. Aus zweierlei Gründen ist im allgemeinen nur der ungeladene Arzneistoff in der Lage, die Membranpassage durchzuführen. Zum einen weist das geladene Molekül durch seine Hydrathülle ein erheblich größeres Volumen im Vergleich zur ungeladenen Verbindung auf. Zusätzlich erschwert der Ladungszustand selbst den Membrandurchtritt. Da Membranen ebenfalls zu einem großen Teil aus geladenen Molekülen bestehen, wird das ionisierte Pharmakon bei gleichem Ladungszustand von der Membran abgestoßen oder bei entgegengesetztem Ladungszustand von der Membran elektrostatisch gebunden. Die große Bedeutung des Ionisationsgrades für das kinetische Verhalten dissoziabler Pharmaka wird aus den genannten Zusammenhängen unmittelbar ersichtlich.

Doch auch das dynamische Wirkprofil vieler Pharmaka steht in enger Beziehung zum Ionisationsgrad. Die meisten heute gebräuchlichen Wirkstoffe sind entweder schwache Säuren oder schwache Basen, die bei physiologischem pH nicht vollständig dissoziieren. Das Konzentrationsverhältnis von dissoziiertem zu undissoziiertem Anteil gibt die Dissoziationskonstante an. Der für die Rezeptoranpassung verantwortliche Anteil wird als die Wirkform des Pharmakons bezeichnet. Für alle Möglichkeiten von Pharmakonwirkformen sind Beispiele aus der Literatur bekannt. ALBERT und Mitarbeiter (1945) konnten zeigen, daß die antibakterielle Wirksamkeit von Acridinmolekülen mit zunehmendem Ionisationsgrad ansteigt. BELL und ROBLIN (1942) wiesen eine ähnliche Be-

ziehung für Sulfonamidderivate nach. HARDMAN (1962) schrieb die stimulierende Wirkung von Theophyllin am Schildkrötenherzen der ungeladenen Form zu. BAIRD und HARDMAN (1962) berichteten über eine sehr interessante Differenzierungsmöglichkeit zwischen den verschiedenen Teilwirkungen des Lokalanaesthetikums Procain. Nach ihren Befunden ist die negativ inotrope Wirkung dem unprotonierten Molekül und die antiarrhythmische Wirksamkeit dem Procainkation zuzuordnen.

Die erstmals von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten pK-Messungen für die wichtigsten Kalziumantagonisten (MANNHOLD et al.,1980) zeigen, daß bei physiologischem pH alle Verbindungen zu mehr als 90% ionisiert vorliegen und die Wirkform der genannten Substanzen mit größter Wahrscheinlichkeit das protonierte Molekül ist. Interessanterweise gilt dies nicht für den Kalziumantagonisten Nifedipine, der nach unseren Messungen bei physiologischem pH unprotoniert vorliegt und seine Rezeptorwechselwirkung deshalb in Form der freien Base ausüben muß. Diese Ergebnisse liefern einen weiteren Beweis für differente molekulare Wirkungsmechanismen der beiden wichtigsten Kalziumantagonisten Nifedipine und Verapamil. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß die bei vielen Kalziumantagonisten beobachtete Frequenz- und Potentialabhängigkeit der negativ inotropen Wirkung nur bei solchen Stoffen auftritt, die bei physiologischem pH protoniert vorliegen. Bei Nifedipine sind die genannten Eigenschaften nicht zu beobachten. Die gleiche Abhängigkeit der potentialabhängigen Wirkung vom Ladungszustand des Stickstoffs ist für zahlreiche Antiarrhythmika von HONDEGHEM und KATZUNG (1977) belegt worden. Diese Beziehungen werden leicht verständlich, wenn man sich den wesentlichen Einfluß vergegenwärtigt, den der Ladungszustand des Moleküls auf die möglichen Bindungskräfte zwischen Arzneistoffen und Rezeptoren ausübt. Den im protonierten Zustand möglichen Ionenbindungen an Rezeptoren entsprechen Wechselwirkungsenergien von -5 bis -10 kcal/mol, die damit außer den relativ selten anzutreffenden kovalenten Bindungen die wichtigste Form der Rezeptoranbindung repräsentieren. Diese Wechselwirkungsmöglichkeit ist für das unprotonierte Nifedipinmolekül nicht gegeben, wie auch darüber hinaus Struktur-Wirkungsanalysen von RODENKIRCHEN et al. (1979) bewiesen haben.

An der glatten Muskulatur konnte TRIGGLE (1980) eine entgegengesetzte Abhängigkeit der Methoxyverapamilwirkung vom Ladungszustand nachweisen. Nach seinen Untersuchungen wird die erschlaffende Wirkung von D 600 am Longitudinalmuskel des Meerschweinchenileums bei alkalischen pH-Werten verstärkt; dies deutet auf die Möglichkeit, daß am glatten Muskel die freie Base als Wirkform fungieren könnte. Bei derartigen pH-Experimenten ist allerdings zu bedenken, daß auch die Rezeptoren dissoziabel sind und damit pH-abhängige Strukturen darstellen. pH-Variationen können die Rezeptorstruktur in unkontrollierter Weise beeinflussen, was bei der Bewertung von so gewonnenen Ergebnissen berücksichtigt werden sollte. FAIRHURST und Mitarbeiter (1980) kommen bei ihren Bindungsstudien von D 600 an Muskarin-, Opiat- und α-Rezeptoren zu dem gleichen Befund wie TRIGGLE und ordnen die Bindungsfähigkeit an die genannten Rezeptoren dem unprotonierten Molekül zu. Zusammengefaßt läßt sich feststellen: Für die negativ inotrope Wirkung der in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen ist das protonierte Molekül als Wirkform anzusehen. Für die charakteristische Frequenz- bzw. Potentialabhängigkeit der untersuchten Kaziumantagonisten scheint die Protonierbarkeit des Aminostickstoffs eine molekulare Voraussetzung zu sein. Aus den Untersuchungen von FAIRHURST et al. sowie TRIGGLE lassen sich Ansätze erkennen, über den molekularen Ladungszustand die Organselektivität zu steigern.

4.4 DIE STRUKTUR-WIRKUNGSANALYSE

Das pharmakodynamische und pharmakokinetische Verhalten eines Arzneistoffs wird auf zellulärer Ebene durch physikalische und chemische Wechselwirkungen mit Makromolekülen im Organismus bestimmt. Qualität und Ausmaß dieser Wechselwirkungen hängen entscheidend von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der miteinander reagierenden Moleküle ab. Diese wirkbestimmenden Eigenschaften sind wiederum eine Funktion der chemischen Molekülstruktur. So erklären sich einleuchtend die elementaren Beziehungen zwischen chemischen Strukturparametern und biologischen Wirkparametern. Sie stellen die Grundlage des molekularpharmakologischen Verständnisses der Arzneistoffwirkung dar. Die exakte Beschreibung und Bestimmung von "Struktur" und "Wirkung" sind essentielle Voraussetzungen, um gültige Beziehungen zwischen diesen Größen ableiten zu können. Struktur bedeutet nach einer umfassenden Definition von ALBERT (1971) die Zusammenfassung aller physikalischen und chemischen Informationen, die aus der Strukturformel abgelesen oder im Experiment bestimmt werden können. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, die strukturbeschreibenden Parameter für ein Arzneistoffmolekül möglichst vollständig zu charakterisieren. In diesem Zusammenhang erscheint es zweckmäßig, Strukturparameter wie folgt zu unterteilen. Globalparameter wie der Verteilungskoeffizient, der pK-Wert oder die Molrefraktion beschreiben Eigenschaften des Gesamtmoleküls und sind vor allem für die pharmakologische Wirkung strukturunspezifischer Pharmaka von Bedeutung. Regionalparameter dagegen definieren die Eigenschaften von Molekülteilbereichen bzw. Substituenten und determinieren vorwiegend strukturspezifische Arzneistoffeffekte. Die hier einzureihenden Parameter sind ausführlich in Kapitel 2.3. beschrieben. Global- wie Regionalparameter dienen gleichermaßen dazu, die grundlegenden Voraussetzungen molekularer Pharmakonwirkungen quantitativ zu erfassen : das Fett/Wasser-Verteilungverhalten (→Lipophilie), die räumliche Molekülanordnung (→Konformation) und die Ladungsverteilung.

Von gleicher Bedeutung wie die hier angesprochene detaillierte "Struktur"-beschreibung eines Arzneistoffmoleküls ist eine dif-

ferenzierte Betrachtung von "Wirkungs"-parametern. An dieser Stelle ist vor allem die Analyse sowohl der Wirkqualität als auch der Wirkstärke zu nennen. Diese Wirkparameter erlauben dementsprechend die Ableitung qualitativer und quantitativer Struktur-Wirkungsanalysen. Da qualitative SWA die Voraussetzung für gültige quantitative SWA darstellen, seien zunächst die ermittelten qualitativen Beziehungen für die in dieser Arbeit untersuchten Arzneistoffe diskutiert.

Das Ziel qualitativer Struktur-Wirkungsanalysen ist, zur Aufstellung von Wirkhypothesen beizutragen, den essentiellen Strukturbereich eines Arzneistoffmoleküls (→Pharmakophor) zu ermitteln und der Wirkstoffoptimierung (z.B. Elimination von Nebenwirkungen) zu dienen. Experimentell wird dieses Ziel durch die Untersuchung von Enantiomeren, Quaternisierungsprodukten und systematisch abgewandelten Derivaten in einem möglichst einfachen biologischen Testsystem angestrebt.

Ein besonders geeignetes Testsystem zur qualitativen Beurteilung kalziumantagonistischer und strukturverwandter herzaktiver Pharmaka ist die negativ inotrope Wirkung in isolierten Praeparaten wie dem Katzenpapillarmuskel. Wegen der ausgeprägten Frequenzabhängigkeit (BAYER et al., 1975a, 1976, 1978) der negativ inotropen Wirkung vieler Untersuchungssubstanzen stellt die Amplituden-Frequenzbeziehung ein ideales Bewertungskriterium dar (siehe auch Kapitel 3.1. und 3.6.).

Im Hinblick auf qualitative Struktur-Wirkungsbeziehungen haben diese Untersuchungen die folgende wesentliche Erkenntnis ermöglicht. Ein Hauptindiz für eine spezifische (d.h. rezeptorvermittelte) Pharmakonwirkung ist im Falle razemischer Verbindungen das Auftreten unterschiedlicher Wirkungen der jeweiligen Enantiomere. Dies trifft nach unseren Untersuchungen für die razemischen Kalziumantagonisten Verapamil (BAYER et al., 1975b), Prenylamin (RODENKIRCHEN et al.,1980) und Fendilin (MANNHOLD et al.,unveröffentlicht) zu. Beispiele für derartige stereoselektive Wirkungen von spezifischen Kalziumantagonisten an Herz- und Gefäßmuskelpraeparationen sind in der Literatur vielfach belegt. Die ausgeprägte Stereoselektivität von Kalziumantagonisten deutet auf hohe konformative Anforderungen an die Arzneistoff-Rezeptorwechselwirkung dieser Verbindungen hin. Darüber-

hinaus machen diese Befunde einen kompetitiven Antagonismus zwischen Kalzium und den jeweiligen Antagonisten unwahrscheinlich, wie er noch häufig in der Literatur postuliert wird (z.B. KOHLHARDT et al.,1972).
Einen weiteren experimentellen Hinweis auf die strukturspezifische Wirkung der hier untersuchten Kalziumantagonisten liefern die Befunde mit methylquaternisierten Verbindungen. Bei den Kalziumantagonisten Verapamil und Bencyclan führt die Quaternisierung zu einem vollständigen Wirkverlust, während die schwach negativ inotropen Substanzen Dilazep, Hexobendin und Aprindin nach einer solchen Strukturvariation immerhin noch etwa 20 Prozent Restwirkung zeigen.
Über diese Nachweise zur strukturspezifischen Wirkung von Kalziumantagonisten hinaus sind für Verapamil ausführliche Untersuchungen zur Pharmakophorenermittlung durchgeführt worden. Bewertungskriterien waren hier der typische Verapamileffekt auf die Amplituden-Frequenzbeziehung isoton kontrahierender Papillarmuskeln und der Verlauf der daraus abgeleiteten Konzentrations-Wirkungskurven für die höchste benutzte Reizfrequenz (60/min). Das Vorhandensein beider aromatischer Strukturen sowie ein tertiärer Aminostickstoff sind nach diesen Untersuchungen als essentiell für die kalziumantagonistische Verapamilwirkung anzusehen. Dies ergaben Experimente mit dem Spaltprodukt D 619 (= Verlust des Homoveratrylrestes) und dem Metaboliten PR 22 (= N-desmethylverapamil). Die große Bedeutung der Stickstoffsubstitution wird durch Befunde der Autoren SCHOMERUS und Mitarbeiter (1976) sowie SCHLEPPER und Mitarbeiter (1976) noch unterstrichen. Diese Arbeitsgruppen stellten fest, daß die negativ dromotrope Verapamilwirkung einerseits und die Plasmakonzentration des Arzneistoffes andererseits extrem unterschiedliche Zeitverläufe aufwiesen. Als mögliche Begründung für diese Diskrepanz wurde vermutet, daß eventuell Metaboliten einen Beitrag zur antiarrhythmischen Potenz von Verapamil leisten könnten. Dieses Beispiel belegt die praktische Bedeutung qualitativer Struktur-Wirkungsanalysen. Die Kenntnis der essentiellen Molekülbereiche für verschiedene pharmakodynamische Eigenschaften eines Arzneistoffs eröffnet die Möglichkeit, durch gezielte Molekülmanipulation Arzneistoffwirkungen

zu spezifizieren und damit Nebenwirkungen zumindest teilweise zu eliminieren. Es werden im folgenden noch weitere Beispiele angeführt, wie die kalziumantagonistische und die antiarrhythmische Komponente der Verapamilwirkung molekular getrennt werden könnten.
Die ausgeprägte Abhängigkeit des typischen Verapamileffektes von der Art der Stickstoffsubstitution wird auch durch die Ergebnisse mit weiteren Abwandlungsprodukten bestätigt. Der Austausch der N-methyl- gegen eine N-isopropylgruppe führt zu einer starken Wirkminderung. Dies ist wahrscheinlich durch sterische Hinderung der optimalen Wirkstoffanpassung an den biologischen Wechselwirkungspartner zu erklären. Die pK-Wertanalyse (siehe 3.5.) hatte ergeben, daß die protonierte Verbindung die Wirkform des Verapamil darstellt und damit eine ionogene Rezeptorbindung für diesen Molekülteil anzunehmen ist. Die sterische Hinderung eines so entscheidenden Bindungsbetrags muß in einer deutlichen Wirkminderung resultieren. Auf die wichtigen Erkenntnisse mit N-methyl-quaternisierten Derivaten wird bei der Diskussion des Wirkorts von Verapamil und anderen Kalziumantagomisten eingegangen.

Substituenten der beiden aromatischen Ringe sowie die Isopropylgruppe sind nicht essentiell für die frequenzabhängig negativ inotrope Wirkung von Verapamil. Diese Molekülteile üben aber einen großen Einfluß auf die Wirkstärke der Ausgangsverbindung aus und sind als sogenannte sekundäre Bindungsstellen einzustufen. Bei den beiden Benzolstrukturen konzentrieren sich die Untersuchungen aus zwei Gründen auf den aromatischen Ring in der Nähe des asymmetrischen Kohlenstoff. Aus der Stereoselektivität der Verapamilwirkung muß man schließen, daß die entscheidenden Molekülstrukturen zumindest überwiegend in der Nähe des asymmetrischen Kohlenstoffs lokalisiert sein müssen. Des weiteren üben die Substituenten dieses Aromaten einen größeren Einfluß auf die Wirkstärke aus als die Substituenten des weiter entfernt liegenden Benzolrings (siehe 3.6.). Vergleicht man die Wirkstärke der untersuchten Verbindungen mit dem entsprechenden Substitutionsmuster (siehe 7.2.1.), dann fällt auf, daß stark wirksame Verbindungen alle meta-Substitution aufweisen und

Halogensubstituenten offenbar einen günstigen Einfluß auf die Wirkstärke ausüben. Besonders betont seien die Unterschiede zwischen den beiden stellungsisomeren Methoxyderivaten. D 846 mit zwei Methoxysubstituenten in 2,6-Position ist nur halb so wirksam wie Verapamil mit zwei Methoxysubstituenten in 3,4-Position. Die sterische Hinderung der bevorzugt koplanaren Konformation durch die orthoständigen Methoxygruppen im D 846-Molekül dürfte die Erklärung für die beobachtete Wirkminderung sein. Die optimale Konformation für die Rezeptoranpassung scheint in dieser Verbindung schwer einstellbar zu sein. Die Verbindung D 846 ist über diese Befunde hinaus von großem Interesse, da hier bei Minderung der inotropen Wirkstärke eine deutliche Zunahme der antiarrhythmischen Potenz zu beobachten war. Am linken Ring orthosubstituierte Verapamilderivate liefern somit einen weiteren realistischen Ansatz zur Auftrennung kalziumantagonistischer und antiarrhythmischer Wirkkomponenten, der durch Einsatz positiv induktiver bzw. mesomerer Substituenten wie im Falle der Lokalanaesthetika noch optimiert werden könnte.

Neben der Verbindungsreihe mit unterschiedlicher Substitution am Ring A (näher am asymmetrischen Kohlenstoff) wurde eine Gruppe von Verapamilderivaten mit symmetrischer Metasubstitution an beiden Aromaten untersucht. Diese Experimente dienten insbesondere dazu, die Bedeutung lipophiler und sterischer Substituenteneigenschaften für die Wirkstärke von Verapamil zu klären. Die Untersuchungen ergaben, daß die negativ inotrope Potenz mit zunehmender Lipophilie bzw. Substituentenvolumen abnahm. Derivate mit ausgesprochen raumerfüllenden Substituenten wirken auch qualitativ nicht mehr wie die Ausgangsverbindung Verapamil. Unsere in vitro gewonnenen Befunde zur Bedeutung der Ringsubstitution für den negativ inotropen Effekt von Verapamil stehen in Einklang mit Ergebnissen der in vivo-Experimente von HAAS und BUSCH (1967). Ihre Untersuchungen zur hypotensiven Wirksamkeit von Verapamilderivaten an physostigminbehandelten, anaesthetisierten Ratten zeigten, daß vor allem halogensubstituierte Verbindungen besonders blutdruckwirksam waren.

Bezüglich der Isopropylgruppe gelten die gleichen Zusammenhänge wie für die Ringsubstituenten. Steigerung der Lipophilie bzw.

des Volumens bei Austausch der Isopropylgruppe gegen andere Substituenten führt zu einer deutlichen Wirkminderung. Nach den bisher durchgeführten Struktur-Wirkungsanalysen sind die beiden Aromaten und der tertiäre Aminostickstoff essentielle, die Isopropylgruppe und die Ringsubstituenten nicht essentielle Molekülstrukturen für die kalziumantagonistische Verapamilwirkung.
Bisher nicht untersucht werden konnte die Bedeutung der Nitrilgruppe, die auf Grund ihres polaren Charakters und ihrer Nähe zum asymmetrischen Kohlenstoff eine potentielle Bindungsstelle darstellt. In diesem Zusammenhang erscheinen die Erkenntnisse von GERO und REESE (1956) besonders interessant. Nach diesen Autoren ist bei einer großen Zahl von Pharmaka zwischen den wichtigsten funktionellen Gruppen im Molekül ein Abstand von etwa 5,5 Å festzustellen. Diese räumliche Distanz trifft auch auf den Abstand zwischen Nitrilgruppe und Aminostickstoff im Verapamilmolekül zu. Auffallenderweise entspricht die genannte Entfernung nach Angaben von PAULING et al. (1951) dem Abstand zweier Windungen einer α-Protein-Helix. Da der biologische Wechselwirkungspartner von Verapamil wahrscheinlich Proteincharakter hat, sind auf Grund der genannten Zusammenhänge interessante Ansätze für weitere Untersuchungen gegeben.

Die bisher diskutierten Befunde zur qualitativen Struktur-Wirkungsanalyse dienen einerseits der Ermittlung der pharmakophoren Molekülstruktur und stellen andererseits die Grundlage zur Ableitung quantitativer Struktur-Wirkungsbeziehungen dar. Für nicht essentielle Strukturbereiche werden quantitative Interpretationen der Beziehungen zwischen chemischer Struktur und biologischer Wirkung angestrebt. Im Falle von Verapamil konnten solche Analysen für die Strukturbereiche der Isopropylgruppe sowie der Ringsubstituenten durchgeführt werden. Substituierte oder unsubstituierte aromatische Strukturen genießen das Interesse des Molekularpharmakologen, da sie besonders geeignete sekundäre Bindungsstellen repräsentieren (VARGA und NADOR, 1968; SEITZ, 1976). Die überwiegende Zahl der heute klinisch gebräuchlichen Pharmaka weist aus folgenden Gründen eine oder mehrere aromatische Strukturen im Molekülverband auf:

1) Aromaten können als Bindungspartner in hydrophoben, van der Waals- und charge-transfer-Bindungen fungieren, und
2) Art und Stärke dieser Bindungen können durch Ringsubstitution gezielt beeinflußt werden.

Verschiedene Autoren haben die Bedeutung der Ringsubstitution für die Wirkstärke von Kalziumantagonisten untersucht. NAGAO et al. (1973) konnten zeigen, daß die koronargefäßerweiternde Wirkung von Diltiazem abgeschwächt wird, wenn die 4'-Methoxygruppe am Benzolring in Position 2 durch andere Substituenten ersetzt wird. RODENKIRCHEN und Mitarbeiter (1979) wiesen nach, daß vor allem sterische Eigenschaften von 2'-Phenylsubstituenten die Varianz der biologischen Wirkung ringvariierter Nifedipinederivate determinieren.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur quantitativen Struktur-Wirkungs-Analyse galten dem Versuch, die molekulare Bedeutung der aromatischen Ringe im Verapamilmolekül und deren Substituenten zu klären. Aus bereits angeführten Gründen waren der Benzolring A (siehe 7.2.1) und dessen Substituenten von besonderer Bedeutung. Korrelationen der negativ inotropen Wirkung mit elektronischen, sterischen und hydrophoben Substituentenparametern haben eindeutig erbracht, daß elektronische und hier insbesondere induktive Substituenteneigenschaften die Wirkstärke von Verapamil bestimmen. Induktive Substituenteneigenschaften werden quantitativ durch die Feldkonstante (F) charakterisiert. Induktive Effekte beruhen auf den elektronenziehenden (= negativ induktiv) bzw. elektronenschiebenden (= positiv induktiv) Eigenschaften, die Atome oder Substituenten in Einfachbindungen auf Grund ihrer relativen Elektronegativität ausüben können. Positive F-Werte zeigen an, daß ein Substituent die Elektronendichte eines aromatischen Rings durch seine elektronenziehenden Eigenschaften mindert. Die umgekehrten Verhältnisse gelten für negative F-Werte. Die Korrelationsergebnisse mit ringvariierten Verapamilderivaten lassen sich daher so interpretieren, daß eine Verbindung dieser Reihe um so stärker negativ inotrop wirkt, je ausgeprägter die jeweiligen Substituenten die Elektronendichte des Benzolrings mindern. Ganz generell sind induktive Effekte

von Substituenten in meta-Position stärker wirksam als in para-Position. Dementsprechend üben auch meta-Substituenten den stärksten Einfluß auf die negativ inotrope Wirksamkeit aus. Zum Beispiel ist die Verbindung D 600 mit zwei metaständigen Methoxygruppen etwa doppelt so wirksam wie Verapamil mit nur einer metaständigen Methoxygruppe. Aus den gleichen Gründen weisen die schwächsten Verbindungen dieser Reihe, D 557 und Sz 51 lediglich parastädige Substituenten auf.
Bezüglich der Arzneistoff-Rezeptor-Wechselwirkung können diese Resultate auf zweierlei Weise interpretiert werden.
Entweder die Substituenten binden direkt über ionogene Wechselwirkungen an eine Rezeptorbindungsstelle oder sie beeinflussen indirekt die Rezeptoranbindung durch ihre modulierenden Einflüsse auf die Elektronendichte des Benzolrings. Mit dem HANSCH-Verfahren kann diese Frage nicht eindeutig geklärt werden. Doppelkorrelationen der biologischen Aktivität ringvariierter Derivate mit der Feldkonstanten F und einem zusätzlichen hydrophoben oder sterischen Parameter ergaben nur geringfügige, statistisch nicht signifikante Verbesserung der Ergebnisse. Da die bisherigen Untersuchungen die herausragende Bedeutung der Metasubstitution bewiesen hatten, wurde eine zweite Derivatereihe mit symmetrischer m-Alkoxylierung an beiden Ringen getestet, um die Bedeutung sterischer bzw. hydrophober Effekte eindeutig zu klären.
Einzelkorrelationen bestätigen auch in dieser Gruppe die wesentliche Bedeutung der induktiven Substituenteneigenschaften. Eine signifikante Beziehung wurde nur mit der Feldkonstanten F erhalten. Sowohl die Kombination mit sterischen (F+MR) als auch mit hydrophoben Parametern (F+π) ergaben signifikante Doppelkorrelationen. Molekularpharmakologische Signifikanz kommt aber nur der ersteren Kombination zu. Dies ergibt sich aus der Wiederholung der Korrelation mit reduzierten Datensätzen, d.h. unter Auslassung von Derivaten mit besonders hoher bzw. niedriger Aktivität. Da nur die Kombination aus elektronischen und sterischen Parametern (F+MR) auch für reduzierte Datensätze signifikante Korrelationen ergibt, sind auch nur in diesem Falle physikalisch-chemisch sinnvolle Interpretationen der statistischen Daten zu erwarten.

Die HANSCH-Analyse isopropylabgewandelter Verapamilderivate machte es wahrscheinlich, daß die molekulare Bedeutung dieser Gruppe auf hydrophoben Effekten beruht.
Zusammengefaßt lassen die erhaltenen Befunde mit dem Verfahren der HANSCH-Analyse folgende Interpretationen zu:
Ringsubstituenten beeinflussen die negativ inotrope Wirkstärke von Verapamilderivaten vornehmlich über ihre negativ induktiven Eigenschaften. Sterische Eigenschaften sind von sekundärer Bedeutung und drücken sich bei zunehmendem Substituentenvolumen in einer sterischen Hinderung der Rezeptorwechselwirkung aus. Der Einfluß der Isopropylgruppe auf die Wirkstärke beruht wahrscheinlich auf hydrophoben Effekten.
Da das HANSCH-Verfahren in einigen Fragestellungen (Arzneistoff-Konformation, potentielle chemische Natur des Wechselwirkungspartners) keine befriedigenden Ergebnisse liefert, wurde ergänzend das Monopol-Bindungspolarisierbarkeitsverfahren angewandt. Die wichtigsten Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen sollen im folgenden diskutiert werden. Die Konformationsanalyse hat ergeben, daß der Benzolring A und die Nitrilgruppe unabhängig von der jeweiligen Ringsubstitution immer koplanar zueinander angeordnet sind. Durch dieses Ergebnis lassen sich die Wirkunterschiede zwischen den stellungsisomeren Methoxyverbindungen Verapamil und D 846 erklären. Die orthoständigen Methoxygruppen im Falle des D 846 beeinträchtigen die Einstellung der energetisch günstigen koplanaren Konformation und damit wahrscheinlich die Möglichkeit der optimalen sterischen Anpassung an den Wechselwirkungspartner.
Die Korrelation der negativ inotropen Potenz ringvariierter Derivate mit berechneten Wechselwirkungsenergien zu Aminosäure-Modellrezeptorstrukturen führten zu dem hochinteressanten Ergebnis, daß die Aminosäure Arginin mit größter Wahrscheinlichkeit als Rezeptorbindungsstelle für den unterschiedlich substituierten aromatischen Bereich von Verapamilderivaten angesehen werden kann.
Diese Ergebnisse stehen in sehr guter Übereinstimmung mit den Befunden aus der HANSCH-Analyse, wonach negativ induktive Substituenteneigenschaften die negativ inotrope Wirkstärke determinieren. Substituenten mit negativer Partialladung führen

daher auch zu den stärkst wirksamen Verbindungen. Daß Arginin mit einer positiven Partialladung in seiner Guanidinteilstruktur einen idealen Bindungspartner für ionogene Bindungen mit den Ringsubstituenten darstellt, wird durch die kombinierte Anwendung der beiden Analyseverfahren einleuchtend belegt. Die abschließende Abbildung faßt die neuen Erkenntnisse zur Struktur-Wirkungsanalyse von Verapamil zusammen.

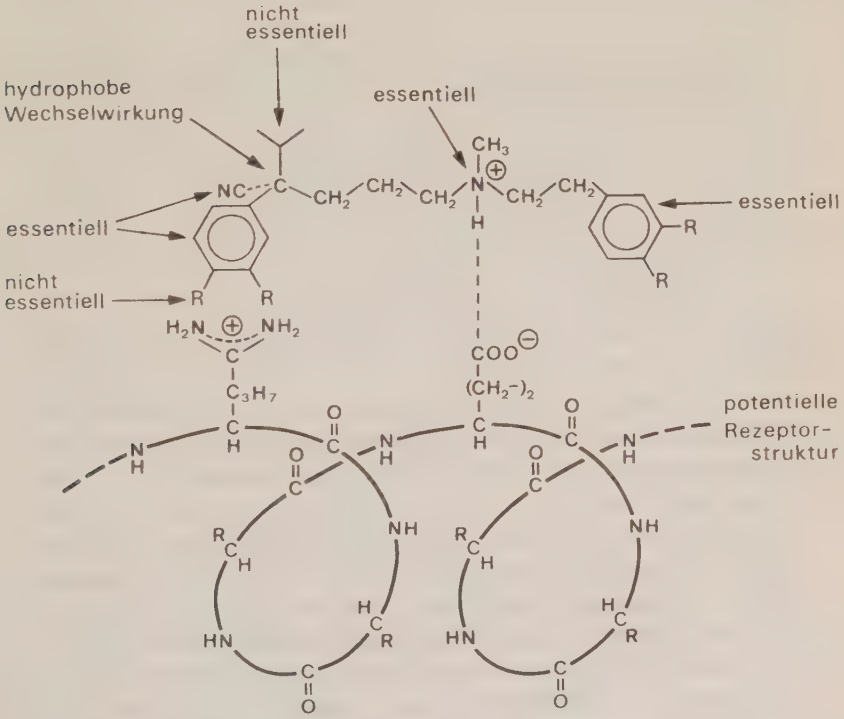


Abb. 38: Zusammenfassende Darstellung der Erkenntnisse zur Struktur-Wirkungsbeziehung von Verapamil.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1) Die negativ inotropen Eigenschaften der Kalziumantagonisten Verapamil, Prenylamin, Fendilin, Bencyclan, Bepridil und Tiapamil sowie der strukturverwandten herzaktiven Pharmaka Mebeverin, Dilazep, Hexobendin und Aprindin wurden am isoton kontrahierenden Katzenpapillarmuskel analysiert.

2) Die Untersuchungen zur Wirkqualität der genannten Pharmaka ergaben die folgende Klassifizierung:

   I) Arzneistoffe, die die Kontraktionsamplituden insbesondere bei hohen Reizfrequenzen senken (Verapamil, Tiapamil, Fendilin),

   II) Pharmaka, die unabhängig von der gewählten Reizfrequenz negativ inotrop wirken (Prenylamin), und

   III) Arzneistoffe, die die Kontraktionsamplituden insbesondere bei niedrigen Reizfrequenzen senken (Bencyclan, Mebeverin, Dilazep, Hexobendin, Aprindin).

3) Es ließ sich weiterhin zeigen, daß die qualitative Wirkung der Verbindungen innerhalb der einzelnen Gruppen nicht völlig identisch ist. Während unter Verapamil biphasische Treppen nach Frequenzwechsel auftreten, sind unter Tiapamil und Fendilin (beide ebenfalls in Gruppe I) nur monophasische Übergänge zu beobachten. Die Ermittlung von Amplituden-Pausenbeziehungen erlaubte folgende Differenzierung der inotropen Eigenschaften: Während Verapamil frequenzabhängig die Wiederverfügbarkeit des vom SR zurückgebundenen Kalziums hemmt, wird unter Tiapamil die im SR gespeicherte Kalziummenge insgesamt verringert. Als generelle Regel läßt sich aus diesen Untersuchungen ableiten, daß die Restitutionskinetik umso stärker verlangsamt wird, je höher der Frequenzquotient für die negativ inotrope Wirkung der jeweiligen Substanz ist.

4) Pharmaka aus Gruppe III lassen mit Ausnahme von Aprindin die transitorischen Übergänge nach Frequenzwechsel praktisch unbeeinflußt. Die erforderlichen hohen Wirkstoffkonzentrationen lassen auf strukturunspezifische hydrophobe Membranwechselwirkungen als Wirkmechanismus dieser Stoffe schließen.

5) Untersuchungen mit den Enantiomeren von Verapamil, Prenylamin und Fendilin bestätigen die Hypothese, daß die negativ inotropen Effekte von Verbindungen aus Gruppe I und II strukturspezifisch sind. Die Experimente zeigten, daß die inotropen Eigenschaften der genannten Verbindungen zumindest stereoselektiv und in allen Fällen dem linksdrehenden Isomer zuzuordnen sind. Die isomerischen Quotienten schwanken zwischen 122 für Verapamil und 1.4 für Fendilin. Im Falle des Prenylamin konnte darüberhinaus die in niedrigen Dosen bei niedrigen Reizfrequenzen auftretende positiv inotrope Wirkung dem rechtsdrehenden Isomer zugeschrieben werden.

6) Neben diesen Untersuchungen zur qualitativen und quantitativen Charakterisierung der negativ inotropen Eigenschaften wurde mit verschiedenen experimentellen Ansätzen der Versuch unternommen, zur Wirkortanalyse der Untersuchungssubstanzen beizutragen. Die Fähigkeit zur Membranpassage von Arzneistoffen ist eine Funktion ihrer Fettlöslichkeit. Die dünnschichtchromatographische Ermittlung dieser physikalisch-chemischen Eigenschaft ergab, daß Kalziumantagonisten im Vergleich der wichtigsten herzwirksamen Arzneistoffe die größte Lipophilie aufweisen und damit grundsätzlich Membranpassagen durchführen können.

7) Zur Wirkortanalyse membranwirksamer, stickstoffhaltiger Pharmaka werden häufig Quaternisierungsprodukte eingesetzt. Während die Quaternisierungsprodukte der Kalziumantagonisten Verapamil und Bencyclan nahezu vollständig unwirksam sind, zeigen die quaternisierten Abwandlungsprodukte der strukturverwandten Pharmaka Dilazep, Aprindin und Hexobendin eine Restwirkung von bis zu 20%. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die beiden Kalziumantagonisten intrazelluläre Wirkorte aufweisen, während die strukturunspezifisch wirkenden Vergleichssubstanzen extrazellulär angreifen und nur in Abhängigkeit ihrer verminderten Lipophilie schwächer negativ inotrop wirken.

8) Als weitere Bestätigung der bisher vorgestellten Befunde darf die Untersuchung der zellulären Lokalisation mit Hilfe der LAMMA-Analyse gelten. Für den wichtigsten Kalziumantagonisten, Verapamil, konnte eine zehnfache intrazelluläre Anreicherung nachgewiesen und die Hypothese eines intrazellulären Wirkorts weiter untermauert werden.

9) Die pK-Wertbestimmung der Untersuchungssubstanzen anhand der potentiometrischen Mikrotitration erbrachte, daß alle Stoffe bei physiologischem pH zu 90% oder mehr protoniert vorliegen und die ionisierten Verbindungen mit größter Wahrscheinlichkeit die biologisch aktive Wirkform darstellen.

10) Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur qualitativen und quantitativen Struktur-Wirkungsanalyse von Verapamil, einem klinisch besonders bedeutsamen Kalziumantagonisten durchgeführt.
Wesentliches Ziel der qualitativen Struktur-Wirkungsanalyse ist es, zwischen essentiellen und nicht essentiellen Molekülteilen eines Pharmakons zu differenzieren. Kriterium zur Ableitung qualitativer Struktur-Wirkungsbeziehungen war die Amplituden-Frequenzbeziehung. Aufgrund der hier durchgeführten Untersuchungen sind der tertiäre Aminostickstoff sowie das Vorhandensein beider Ringsysteme essentiell für die frequenzabhängig negativ inotrope Verapamilwirkung.

11) Die Ringsubstituenten und die Isopropylgruppe sind nicht essentielle Molekülteile, die aber einen ausgeprägten Einfluß auf die Wirkstärke ausüben. Unter den ringvariierten Derivaten erwiesen sich Halogensubstituenten als besonders stark, Alkylsubstituenten als besonders schwach wirksam. Substituenten in ortho-Stellung hatten einen schwächeren Effekt als Substituenten in meta- oder para-Position. Wahrscheinlich sind diese beobachteten Wirkunterschiede in sterischen Effekten begründet. Übersteigt das Substituentenvolumen einen bestimmten Umfang, dann ist der frequenzspezifisch negativ inotrope Effekt nicht mehr zu beobachten. Die log $1/ED_{50}$-Werte nehmen mit steigendem Substituentenvolumen ab.

12) Auf der Basis der qualitativen Struktur-Wirkungsanalyse konnte eine umfangreiche quantitative Struktur-Wirkungsanalyse mit Hilfe des HANSCH-Verfahrens durchgeführt werden. Hierbei wird die biologische Aktivität eines Pharmakons (ED_{50} für den negativ inotropen Effekt bei der Reizfrequenz 60/min) mit geeigneten physikochemischen Arzneistoffeigenschaften (numerische Beträge für hydrophobe, sterische und elektronische Substituentenparameter) regressionsanalytisch in eine quantitative Beziehung gesetzt. Derartige Korrelationen zeigen, daß die negativ inotrope Wirkstärke im wesentlichen von elektronischen Substituenteneigenschaften abhängt. Um alle Formen elektronischer Wechselwirkungen beurteilen zu können, wurden für verapamilanaloge Benzolderivate die Polarisierbarkeit und das Dipolmoment bestimmt. Unter allen elektronischen Parametern ergibt sich die beste Korrelation mit der Feldkonstanten F, die die induktiven Effekte von Ringsubstituenten quantifiziert. Daraus muß man auf die Beteiligung ausgeprägter ionogener Wechselwirkungskräfte bei der Rezeptorwechselwirkung schließen. Aus der guten Korrelation mit der Feldkonstanten F ergibt sich außerdem, daß meta-Substituenten den stärksten Einfluß auf den negativ inotropen Effekt ausüben.

13) Da in der ersten untersuchten Derivatereihe (Strukturvariation nur am linken Ring) die zusätzliche Bedeutung sterischer bzw. lipophiler Substituenteneffekte nicht eindeutig geklärt werden konnte, wurde eine zweite Derivatereihe (symmetrische Alkoxylierung in der besonders wichtigen meta-Position an beiden Aromaten) in die Untersuchungen einbezogen. Mit Hilfe dieser Verbindungen konnte gezeigt werden, daß eine Parameterkombination aus der Feldkonstanten F und dem sterischen Parameter MR (Molrefraktion) die Varianz der biologischen Wirkstärke dieser Derivate am besten zu erklären vermag. Die Befunde mit dem HANSCH-Verfahren lassen folgende Interpretation zu: Ringsubstituenten beeinflussen die negativ inotrope Wirkstärke von Verapamilderivaten vornehmlich über ihre negativ induktiven Substituenteneigenschaften. Meta-Substituenten sind aus

diesem Grunde von entscheidender Bedeutung. Sterische Effekte sind nur sekundär wichtig und dürften sich bei zunehmendem Substituentenvolumen in einer sterischen Hinderung der Arzneistoff-Rezeptor-Wechselwirkung ausdrücken.

14) Da das HANSCH-Verfahren in einigen Fragestellungen (Arzneistoffkonformation, potentielle chemische Struktur des biologischen Wechselwirkungspartners) keine befriedigenden Antworten liefert, wurde ergänzend das Monopol-Bindungspolarisierbarkeitsverfahren angewandt. Dieses Verfahren erlaubt, auf der Grundlage von Wechselwirkungs-Energieberechnungen zwischen Arzneistoffmolekülen und Aminosäuremodellrezeptoren Erkenntnisse über die potentielle chemische Struktur von in vivo-Bindungsstellen zu gewinnen. Korrelationen der negativ inotropen Potenz ringvariierter Verapamilderivate mit deren Wechselwirkungsenergie zur Modellrezeptorstruktur Arginin lassen erkennen, daß diese Aminosäure die chemischen Bedingungen für eine sekundäre Bindungsstelle des aromatischen Bereichs im Verapamilmolekül hervorragend erfüllt.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ABBOTT, N.J., DEGUCHI, T., FRAZIER, D.T., MURAYAMA, K., NARAHASHI, T., OTTOLENGHI, A., WANG, C.M. (1972):
The action of phospholipases on the inner and outer surface of the squid giant axon.
J. Physiol. (London) 220, 73-86

ADAMS, R.J., SCHWARTZ, A. (1980):
Comparative Mechanisms for Contraction of Cardiac and Skeletal Muscle
Chest Suppl. 78 : 1, 123-139

ALBERT, A. (1971):
Relationships between molecular structure and biological activity: stages in the evolution of current concepts.
Ann. Rev. Pharmacol. 11, 13-36

ALBERT, A., RUBBO, S.D., GOLDACRE, S.D., DAVEY, M.E., STONE, J.D. (1945):
The influence of chemical constitution on antibacterial activity. Part II: A general survey of the acridine series.
Brit. J. Exp. Path. 26, 160-192

ARIENS, E.J. (1966):
Molecular pharmacology, a basis for drug design.
Prog. Drug Res. 10, 429-529

ARMSTRONG, C.M., BEZANILLA, F., ROJAS, E. (1973):
Destruction of sodium conductance inactivation in squid axon perfused with pronase.
J. Gen. Physiol. 62, 375-391

BAIRD, W.M., HARDMAN, H.F. (1962):
An analysis of the effect of pH, procaine, non-ionized procaine and procaine ethyl chloride cation upon cardiac conduction time, stimulation threshold, amplitude of contraction and the relationship of these parameters to antiarrhythmic activity.
J. Pharm. Exp. Ther. 132, 382-391

BAKER, P.F., MEVES, H., RIDGEWAY, E.B. (1973):
Effects of manganese and other agents on the calcium uptake that follows depolarization of squid axons.
J. Physiol. (London) 231, 511-526

BASSINGTHWAIGHTE, J.B., BEELER, G.W., SIDELL, P.M., REUTER. H., SAFFORD, R.E. (1973):
A model for calcium movements and excitation-contraction coupling in cardiac cells.
In: Regulation and control in physiological systems.
pp. 36-38
Proceedings ISA, Pittsburg

BASSINGTHWAIGHTE, J.B., REUTER, H. (1972):
Calcium movements and excitation-contraction coupling in cardiac cells.
In: Electrical phenomena in the heart (W.C. de Mello, ed.) pp. 353-395
Academic Press, London-New York

BAYER, R. (1982):
Grundprozesse der elektro-mechanischen Koppelung im Myokard.
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, in Druck

BAYER, R., EHARA, T. (1978):
Comparative studies on calcium antagonists.
Progr. Pharmacol. 2, 31-37

BAYER, R. EPP, G. (1979):
Effects of RO 11-1781 on electrical properties of isolated cat myocardium.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 307, R 157

BAYER, R., HENNEKES, R., KAUFMANN, R., MANNHOLD, R. (1975 a):
Inotropic and electrophysiological actions of verapamil and D 600 in mammalian myocardium. I. Pattern of inotropic effects of the racemic compounds.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 290, 49-68

BAYER, R., KALUSCHE, D., KAUFMANN, R., MANNHOLD, R. (1975 c):
Inotropic and electrophysiological actions of verapamil and D 600 in mammalian myocardium. III. Effects of the optical isomers on transmembrane action potentials.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 290, 81-97

BAYER, R., KAUFMANN, R., GUDJONS, M. (1977):
The effects of diphenylhydantoin on mechanical and electrical properties of isolated cat myocardium.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 298, 273-282

BAYER, R., KAUFMANN, R., MANNHOLD, R. (1975 b):
Inotropic and electrophysiological actions of verapamil and D 600 in mammalian myocardium. II. Pattern of inotropic effects of the optical isomers.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 290, 69-80

BAYER, R., KAUFMANN, R., MANNHOLD, R., RODENKIRCHEN, R. (1982):
The action of specific Ca antagonists on cardiac electrical activity.
Progr. Pharmacol., in press

BAYER, R., LOHE, B., MANNHOLD, R., RODENKIRCHEN, R. (1982):
The action of fendiline and its isomers on mechanical and electrical activity of isolated cat papillary muscle.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., in Vorbereitung

BAYER, R., RODENKIRCHEN, R., EHARA, T., MANNHOLD, R. (1976):
Comparative studies of inotropic and electrophysiological effects of "slow channel inhibitors" in isolated mammalian cardiac muscle.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 293, R21

BECKETT, A.H. (1959):
Stereochemical factors in biological activity.
Prog. Drug Res. 1, 455-530

BELL, P.H., ROBLIN jr., R.O. (1942):
Studies in chemotherapy. VII. A theory of the relation of structure to activity of sulfanilamide type compounds.
J. Am. Chem. Soc. 64, 2905-2917

BIAGI, G.L., BARBARO, A.M., GUERRA, M.C., GAMBA, M.F. (1969):
Partition data of penicillins determined by means of reversed-phase thin-layer chromatography.
J. Chromatogr. 41, 371-379

BIAGI, G.L., GANDOLFI, O., GUERRA, M.C., BARBARO, A.M., CANTELLI-FORTI, G. (1975):
Rm values of phenols. Their relationship with log P values and activity.
J. Med. Chem. 18, 868-882

BIAGI, G.L., GUERRA, M.C., BARBARO, A.M. (1970):
Relationship between lipophilic character and hemolytic activity of testosterone and testosterone esters.
J. Med. Chem. 13, 944-948

BLEEKER, A., VAN ZWIETEN, P.A. (1978):
The negative inotropic effect of Verapamil.
Progr. Pharmacol. 2/1, 39-49

BOYCE, C.B., MILBORROW, B.V. (1965):
A simple assessment of partition data for correlating structure and biological activity using thin-layer chromatography.
Nature 208, 537-539

BRISTOW, M.R., GREEN, R.D. (1977):
Effect of diazoxide, verapamil and compound D 600 on isoproterenol and calcium-mediated dose-response relationships in isolated rabbit atrium.
Eur. J. Pharmacol. 45, 267-279

BROWN, A.C., FRASER, T. (1869):
On the connexion between chemical constitution and physiological action.
Part 1. On the physiological action of the salts of the ammonium bases, derived from strychnia, brucia, thebaia, codeia, morphia and nicotia.
Trans. Roy. Soc. (Edinburgh) 25, 151-204

CARONI, P., CARAFOLI, E. (1980):
An ATP - dependent CA^{2+}- pumping system in dog heart sarcolemma.
Nature 283, 765-767

CARONI, P., MALMSTROEM, K., CARAFOLI, E. (1980):
An ATP-dependent Ca^{2+}transporting system in heart sarcolemma.
Developm. Biochem. 14, 145-146

CHAGAS, C. (1962):
The fate of curare during curarization.
In: Curare and Curare-like Agents (A.V.S. de Reuck, ed.) pp. 2-10,
J. and A. Churchill Ltd., London

CHAPMAN, R.A., NIEDERGERKE, R. (1970):
Interaction between heart rate and calcium concentration in the control of contractile force of the frog heart.
J. Physiol. (London) 211, 423-443

CLARK, A.J. (1926):
The reaction between acetyl choline and muscle cells.
J. Physiol. (London) 61, 530-546

CLAVERIE, P., REIN, R. (1969):
Theory of intermolecular interactions: The long range terms in the dipole-dipole, monopoles-dipole and monopoles-bond polarizabilities approximations.
Int. J. Quantum Chem. 3, 537-551

COATS, E.A. (1973):
Comparative inhibition of thrombin, plasmin, trypsin and complement by benzamidines using substituent constants and regression analysis.
J. Med. Chem. 16, 1102-1106

COSTANTIN, L.L., PODOLSKY, R.J. (1967):
Depolarization of the internal membrane system
in the activation of frog skeletal muscle.
J. Gen. Physiol. 50, 1101-1124

CRAIG, P.N. (1971):
Interdependence between physical parameters and selection
of substituent groups for correlation studies.
J. Med. Chem. 14, 680-684

CRANEFIELD, P.F., ARONSON, R.S., WIT, A.L. (1974):
Effect of verapamil on the normal action potential
and on a calcium-dependent slow response of canine
cardiac Purkinje fibers.
Circ. Res. 34, 204-213

DENBIGH, K.G. (1940):
The polarisabilities of bonds - I.
Trans. Faraday Soc. 36, 936 - 948

DIEMER, J., DÖRFLER, F., MAYER, C.J., ULBRECHT, G. (1974):
Calcium-antagonistic effects on the spontaneous activity
of guinea-pig taenia coli.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 351, 241-258

EHARA, T., KAUFMANN, R. (1978):
The voltage- and time-dependent effects of (-) -verapamil
on the slow inward current in isolated cat ventricular
myocardium.
J. Pharm. Exp.Ther. 207, 49-55

EXNER, O. (1967):
Additive physical properties. II. Molar volume as an
additive property.
Collect. Czech. Chem. Commun. 32, 1-22

EXNER, O. (1975):
Dipole moments in organic chemistry.
Thieme Verlag, Stuttgart

FABIATO, A., FABIATO, F. (1978):
Calcium- induced release of calcium from the sarcoplasmic
reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat,
rabbit, rat and frog hearts and from fetal and new-born
rat ventricles.
Ann. Acad. Sci. (New York) 307, 491-522

FAIRHURST, A.S., WHITTACKER, M.L., EHLERT, F.J. (1980):
Interactions of D 600 (methoxyverapamil) and local anaesthetics with rat brain α-adrenergic and muscarinic receptors.
Biochem. Pharmacol. 29, 155-162

FASTIER, F.N. (1962):
Structure-activity relationships of amidine derivatives.
Pharmacol. Rev. 14, 37-90

FERMUM, R., MEISEL, P., KLINNER, U. (1977):
Versuche zum Wirkungsmechanismus von Gefäßspasmolytika: Wirkung von Nitroprussid-Natrium, Nitroglycerin, Prenylamin und Verapamil an der Fluorid-induzierten Kontraktur isolierter Koronararterien.
Acta Biol. Med. Ger. 36, 245-255

FLECKENSTEIN, A. (1977):
Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers and vascular smooth muscle.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 17, 149-166

FLECKENSTEIN, A., FLECKENSTEIN-GRÜN, G., BYON, Y.K. (1977):
Fundamentale Herz- und Gefäßwirkungen des Ca^{++} - antagonistischen Koronartherapeutikums Fendilin (Sensit).
Arzneim.-Forsch. 27, 562-571

FLECKENSTEIN, A., GRÜN, G., TRITTHART, H., BYON, K., HARDING, P. (1971):
Uterus-Relaxation durch hochaktive Ca^{++}-antagonistische Hemmstoffe der elektromechanischen Koppelung wie Isoptin (Verapamil, Iproveratril), Substanz D 600 und Segontin (Prenylamin).
Klin. Wochenschr. 49, 32-41

FLECKENSTEIN, A., KAMMERMEIER, H., DÖRING, H.J., FREUND, H.J. (1967):
Zum Wirkungsmechanismus neuartiger Koronardilatatoren mit gleichzeitig Sauerstoff-einsparenden Myokardeffekten, Prenylamin und Iproveratril.
Z. Kreislaufforsch. 56, 716-744; 839-858

FLECKENSTEIN, A., TRITTHART, H., FLECKENSTEIN, B., HERBST, A., GRÜN, G. (1969):
A new group of competitive Ca-antagonists (iproveratil, D 600, prenylamine) with highly potent inhibitory effects on excitation-contraction coupling in mammalian myocardium.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 307, R 25

FLECKENSTEIN-GRÜN, G., FLECKENSTEIN, A., BYON, Y.K., KIM, K.W. (1978):
Mechanism of action of Ca^{2+}- antagonists in the treatment of coronary disease with special reference to perhexiline maleate.
In: Proceedings, Symposium on Perhexiline Maleate, Excerpta Medica, Strasbourg-Amsterdam

FREE jr., S.M., WILSON, J.W. (1964):
A mathematical contribution to structure-activity studies.
J. Med. Chem. 7, 395-399

GADDUM, J.H. (1937):
The quantitative effects of antagonistic drugs.
J. Physiol. (London) 89, 7 P

GERO, A., REESE, V.J. (1956):
Chemical model of drug action.
Science 123, 100

GILL, E.W. (1965):
Drug receptor interactions.
Progr. Med. Chem. 4, 39-85

GÖRLITZ, B.D., WAGNER, J., SCHÜMANN, H.J. (1975):
Functional antagonism between calcium-antagonists and noradrenaline on isolated guinea-pig atria.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 288, 311-317

GOLENHOFEN, K., HERMSTEIN, M. (1975):
Differentiation of calcium activation mechanism in vascular smooth muscle by selective suppression with verapamil and D 600.
Blood vessels 12, 21-37

HAAS, H., BUSCH, E. (1967):
Vergleichende Untersuchungen der Wirkung von α-Isopropyl -α-[(N-methyl-N-homoveratryl)]-γ- aminopropyl -3,4- dimethoxyphenylacetonitril, seiner Derivate sowie einiger Coronardilatatoren und ß-Rezeptoraffiner Substanzen.
Arzneim. Forsch. 17, 257-272

HAAS, H.G., Kern, R., BENNINGER, C., EINWÄCHTER, H.M. (1975):
Effects of prenylamine on cardiac membrane currents and contractility.
J. Pharm. Exp. Ther. 192, 688-701

HAMMETT, L.P. (1973):
Physikalische organische Chemie.
2. Auflage pp. 353
Verlag Chemie, Weinheim

HANSCH, C., DEUTSCH, E.W. (1966):
The structure-activity relationship in amides inhibiting photosynthesis.
Biochim. Biophys. Acta 112, 381-391

HANSCH, C., FUJITA, T. (1964):
ρ-σ-π analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure.
J. Am. Chem. Soc. 86, 1616-1626

HANSCH, C., LEO, A., UNGER, S.H., KIM, K.H., NIKAITANI, D., LIEN, E.J. (1973):
"Aromatic" substituent constants for structure-activity correlations.
J. Med. Chem. 16, 1207-1216

HANSCH, C., STEWARD, A.R., ANDERSON, S.M., BENTLEY, D.L. (1968):
The parabolic dependence of drug action upon lipophilic character as revealed by a study of hypnotics.
J. Med. Chem. 11, 1-11

HARDMAN, H.F. (1962):
Molecular form of theophylline responsible for positive inotropic activity.
Circulation Res. 10, 598-607

HASHIMOTO, K., NAKAGAWA, Y., NABATA, H., IMAI, S. (1978):
In vitro analysis of Ca-antagonistic effects of prenylamine as mechanisms for its cardiac actions.
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 231, 212-221

HÄUSLER, G., EIGENMANN, R., BURKARD, W.P. (1972):
Calcium antagonism and inhibition of phosphodiesterase by verapamil.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 274, R 48

HELLENBRECHT, D., LEMMER, B., WIETHOLD, G., GROBECKER, H. (1973):
Measurement of hydrophobicity, surface activity, local anaesthesia and myocardial conduction velocity as quantitative parameters of the non-specific membrane affinity of nine ß-adrenergic blocking agents.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 277, 211-226

HENRY, P.D. (1980):
Comparative pharmacology of Ca^{2+}- antagonists.
Amer. J. Cardiol., in press

HILLE, B. (1975):
Ionic selectivity, saturation and block in sodium channels. A four-barrier model.
J. Gen. Physiol. 66, 535-560

HILLE, B. (1976):
Gating in sodium channels of nerve.
Amer. Rev. Physiol. 38, 139-152

HILLENKAMP, F., KAUFMANN, R., NITSCHE, R., UNSÖLD, E. (1975):
A high sensitivity laser microprobe mass analyzer.
Appl. Phys. 8, 341-348

HODGKIN, A.L., HUXLEY, A.F. (1952):
A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.
J. Physiol. (London) 117, 500-544

HÖLTJE, H.-D. (1974):
Structure-activity studies of enzyme substrates using model interaction calculations.
J. theor. Biol. 48, 197-205

HÖLTJE, H.-D. (1975):
Theoretische Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen bei Monoaminoxidasehemmern der Cyclopropylamin-Reihe.
Arch. Pharmaz. (Weinheim) 308, 438-444

HÖLTJE, H.-D. (1982):
Theoretische Untersuchung zu Struktur-Wirkungsbeziehungen von ringsubstituierten Verapamil-Derivaten.
Arch. Pharm. (Weinheim), in Druck

HÖLTJE, H.-D., MANNHOLD, R., RODENKIRCHEN, R., BAYER, R. (1981):
Theoretical approach to structure-activity relationships of ring substituted verapamil congeners.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 316, R 33

HOMBURGER, H., SCHLEIERMACHER, W., ANTONI, H. (1973):
Time course of postextrasystolic potentiation in isolated atrial and ventricular myocardium of guinea-pig as influenced by changes in frequency, in calcium and by caffeine.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 339, R 5

HONDEGHEM, L.M. KATZUNG, B.G. (1977):
Time - and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels.
Biochim. Biophys. Acta 472, 373-398

ISENBERG, G. (1975):
Is potassium conductance of cardiac Purkinje fibres controlled by (Ca); ?
Nature (London), 253, 273-274

KASS, R.S., Tsien, R.W. (1975):
Multiple effects of calcium antagonists on plateau currents in cardiac Purkinje fibres.
J. Gen. Physiol. 66, 169-192

KAUFMANN, R. (1977):
Differenzierung verschiedener Kalzium-Antagonisten.
Münch. med. Wschr. 119, Suppl. 1, 6-11

KAUFMANN, R., BAYER, R. (1980):
Combination of ß-blockers and calcium antagonists with regard to cardiac electrophysiology.
Excerpta Medica, Elsvier, Amsterdam, pp. 111-119

KAUFMANN, R., BAYER, R., FÜRNISS, T., KRAUSE, H., TRITTHART, H. (1974 a):
Calcium-movement controlling cardiac contractility. II. Analog computation of cardiac excitation-contraction coupling on the basis of calcium kinetics in a multicompartment model.
J. Mol. Cell. Cardiol. 6, 543-559

KAUFMANN, R., BAYER, R., HENNEKES, R., KALUSCHE, D., MANNHOLD, R. (1974 b):
Antidysrhythmic and Ca-antagonistic actions of verapamil and D 600: Stereoselectivity of optical isomers?
Pharmacology Meeting, Graz 1974
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 285, R39

KAUFMANN, R., BAYER, R., RODENKIRCHEN, R., MANNHOLD, R. (1982):
Differentiation of Ca-antagonistic drugs with respect to their myocardial effects.
In: Verapamil-treatment of hypertrophic cardiomyopathy. Springer-Verlag, in press

KAUFMANN, R., HILLENKAMP, F. (1981):
LAMMA - Laser Microprobe Mass Analyzer.
Fresenius Z. Anal. Chem. 308, 193-320

KAUFMANN, R., HILLENKAMP, F., WECHSUNG, R. (1979):
The Laser Microprobe Mass Analyzer (LAMMA), A New Instrument for Biomedical Microprobe Analysis.
Med. Progr. Technol. 6, 109-121

KAUMANN, A.J., SERUR, J.R. (1975):
Optical isomers of verapamil on canine heart.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 291, 347-358

KECSKEMETI, V., KELEMEN, K., KNOLL, J. (1978):
Effect of verapamil and D 600 on cardiac transmembrane potentials.
Acta Physiol. Acad. Scient. Hung. 51, 51-59

KITAYGORODSKI, A.I. (1961):
The interaction curve of non-bonded carbon and hydrogen atoms and its application.
Tetrahedron (London) 14, 230-236

KOCH-WESER, J., BLINKS, J.R. (1963):
The influence of the interval between beats on myocardial contractility.
Pharmacol. Rev. 15, 601-652

KOHLHARDT, M., BAUER, B., Krause, H., FLECKENSTEIN, A. (1972):
Differentiation of the transmembrane Na and Ca channels in mammalian cardiac fibres by the use of specific inhibitors.
Pfügers Arch. ges. Physiol. 335, 309-322

KOHLHARDT, M., FIGULLA, H.R., TRIPATHI, O. (1976):
The slow membrane channel as the predominant mediator of the excitation process of the sinoatrial pacemaker cell.
Basic Res. Cardiol. 71, 17-26

KOHLHARDT, M., FLECKENSTEIN, A. (1977):
Inhibition of the slow inward current by nifedipine in mammalian ventricular myocardium.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 298, 267-272

KOKUCHI, K., HIRATA, M., NAGAOKA, A. (1970):
Hypotensive action of N-ethoxycarbonyl-3- morpholino-sydnonimine, SIN-10.
Jpn. J. Pharmacol. 20, 102-115

KOROLKOVAS, A. (1974):
Grundlagen der molekularen Pharmakologie und der Arzneimittelentwicklung.
Thieme Verlag, Stuttgart

KUBINYI, H. (1979):
Lipophilicity and drug activity.
Progr. Drug Res. 23, 97-198

KUTTER, E., HANSCH, C. (1969):
The use of substituent constants in the quantitative treatment of hapten-antibody interaction.
Arch. Biochem. Biophys. 135, 126-135

LAMBRECHT, G. (1976):
Struktur- und Konformations-Wirkungs-Beziehungen heterocyclischer Acetylcholinanaloga.
I. Muskarinwirkung enantiomerer 3- Acetoxychinuclidine und 3- Acetoxypiperidine.
Eur. J. Med. Chem. 11, 461-466

LAMBRECHT, G. (1977):
Struktur- und Konformations-Wirkungs-Beziehungen heterocyclischer Acetylcholinanaloga.
II. Cholinerge Wirkung isomerer 3- Acetoxythiacyclohexane.
Eur. J. Med. Chem. 12, 41-47

LAMBRECHT, G., MUTSCHLER, E. (1974):
Struktur- und Konformations-Wirkungs-Beziehungen bei zyklischen Acetylcholinanaloga der Piperidin- und Chinuclidin-Reihe.
Arzneim. Forsch. 24, 1725-1729

LANGER, G.A. (1973):
Heart: Excitation- contraction coupling.
Ann. Rev. Physiol. 35, 55-86

LE FEVRE, R.J.W. (1965):
Molecular refractivity and polarizability
Adv. Phys. Org. Chem. 3, 1-90

LEHMANN, P.A.F., RODRIGUES DE MIRANDA, J.F., RIENS, E.J. (1975):
Stereoselectivity and affinity in molecular pharmacology.
Progr. Drug Res. 20, 101-142

LEO, A., HANSCH, C., CHURCH, C. (1969):
Comparison of parameters currently used in the study of structure-activity relationships.
J. Med. Chem. 12, 766-771

LEO, A., HANSCH, C., ELKINS, D. (1971):
Partition coefficients and their uses.
Chem. Rev. 71, 525-616

LINDEN, J., BROOKER, G. (1980):
The influence of resting membrane potential on the effect of verapamil on atria.
J. Mol. Cell. Cardiol. 12, 325-331

LUDWIG, C., NAWRATH, H. (1977):
Effects of D 600 and its optical isomers on force of contraction in cat papillary muscles and guinea-pig auricles.
Br. J. Pharmac. 59, 411-417

LÜLLMANN, H., PETERS, TH. (1977):
Plasmalemmal calcium on cardiac excitation-contraction coupling.
Clin. Exp. Pharm. Physiol. 4, 49-57

MAC LENNAN, D.H., HOLLAND, P. (1975):
Calcium transport in the sarcoplasmic reticulum.
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 4, 377-404

MAGER, H., BARTH, A. (1979):
Problems involved in the specification and interpretation of quantitative structure-activity relationships.
Part 1: Modified type of structure-activity equations.
Pharmazie 34, 557-559

MANNHOLD, R. (1977):
Untersuchungen zum kalziumantagonistischen Wirkungsmechanismus sowie zur Struktur-Wirkungsbeziehung von Verapamil.
Dissertation, Universität Düsseldorf

MANNHOLD, R., BAYER, R. (1976):
Towards a structure-activity relationship of "slow channel inhibitors". Comparative studies of inotropic patterns exerted by some derivatives of verapamil.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 293, R21

MANNHOLD, R., RODENKIRCHEN, R., BAYER, R. (1980):
The role of drug ionization and lipophilicity in cardiodepressant drugs.
Proc. VIIth Internat. Symposium Medicinal Chemistry, P 108, Malaga

MANNHOLD, R., RODENKIRCHEN, R., BAYER, R. (1982):
Qualitative and quantitative structure-activity relationships of specific Ca antagonists.
Progr. Pharmacol., in press

MANNHOLD, R., STEINER, R., HAAS, W., KAUFMANN, R. (1978):
Investigations on the structure-activity relationships of verapamil.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 302, 217-226

MANNHOLD, R., STEINER, R., RODENKIRCHEN, R., KAUFMANN, R. (1977):
Structure-activity relationship of verapamil.
IUPAC-IUPHAR Symposium Biological Activity and Chemical Structure, Noordwijkerhout (Netherlands)

MANNHOLD, R., ZIERDEN, P., BAYER, R., RODENKIRCHEN, R., STEINER, R. (1981):
The influence of aromatic substitution on the negative inotropic action of verapamil.
Arzneim. Forsch. 5, 773-780

MAS-OLIVA, J., NAYLER, W.G. (1980):
The effect of verapamil on the Ca^{2+}- transporting and CA^{2+}- ATPase activity of isolated cardiac sarcolemmal preparations.
Br. J. Pharm. 70, 617-624

MASSINGHAM, R. (1975):
A study of compounds which inhibit vascular smooth muscle contraction.
Eur. J. Pharmacol. 22, 75-82

MCCANS, J.L., LINDENMAYER, G.E., MUNSON, R.G., EVANS, R.W., SCHWARTZ, A. (1974):
A dissociation of positive staircase (Bowditch) from ouabain-induced positive inotropism. Use of verapamil.
Circ. Res. 35, 439-447

MCDONALD, T.F., PELZER, D., TRAUTWEIN, W. (1980):
On the mechanism of slow calcium channel block in heart.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 385, 175-179

MCDONALD, T.F., TRAUTWEIN, W. (1978):
Membrane currents in cat myocardium. Separation of inward and outward components.
J. Physiol. 274, 193-216

MCFARLAND, J.W. (1971):
On the understanding of drug potency.
Prog. Drug Res. 15, 123-146

MEANS, A.R., DEDMAN, J.R. (1980):
Calmodulin - an intracelluar calcium receptor.
Nature 285, 73-77

MEIJLER, F.L. (1962):
Staircase, rest contractions and potentiation in the isolated rat heart.
Am. J. Physiol. 202, 636-640

MEISEL, P., ROHDE, M., RÖNFANZ, M., TEICHMANN, H., FERMUM, R. (1976):
Calcium-Antagonismus als Wirkprinzip von Koronardilatatoren.
Die Pharmazie 31, 417-431

MULLINS, L.J. (1979):
The generation of electric currents in cardiac fibres by Na/Ca exchange.
Am. J. Physiol. 236, C 103-110

NABATA, H. (1977):
Effects of calcium-antagonistic coronary vasodilators on myocardial contractility and membrane potentials.
Jpn. J. Pharmacol. 27, 239-249

NAGAO, T., SATO, M., NAKAJIMA, H., KIYOMOTO, A. (1973):
Studies on a new 1,5 - benzothiazepine derivative (CRD-401). IV. Coronary vasodilating effect and structure-activity relationship.
Chem. Pharm. Bull. 21, 92-97

NAWRATH, H. (1979):
Cardiac effects of verapamil and D 600.
Progr. Pharmacol. 2/4, 55-68

NAWARTH, H., TEN EICK, R.E., MCDONALD, T.F., TRAUTWEIN, W. (1977):
On the mechanism underlying the action of D 600 on slow inward current and tension in mammalian myocardium.
Circ. Res. 40, 408-414

NAYLER, W.G., POOLE-WILSON, PH. (1981):
Calcium antagonists: definition and mode of action.
Basic Res. Cardiol. 76, 1-15

NAYLER, W.G., SZETO, J. (1972):
Effect of verapamil on contractility, oxygen utilization and calcium exchangeability in mammalian heart muscle.
Cardiovasc. Res. 16, 120-128

NGUYEN-DUONG, H., BRECHT, K. (1977):
Untersuchungen über Mechanismen der Kontraktionsauslösung am glatten Gefäßmuskel und ihre Beeinflussung durch Ca-Antagonisten.
Münch. Med. Wochenschr. 119, 512-518

NORRINGTON, F.E., HYDE, R., WILLIAMS, S., WOOTTON, R. (1975):
Physicochemical-activity relations in practice.
I. A rational and self-consistent data bank.
J. Med. Chem. 18, 604-607

NYS, G.G., REKKER, R.F. (1974):
The concept of hydrophobic fragmental constants (f-values).
Eur. J. Med. Chem. 9, 361-375

PATIL, P.N., MILLER, D.D., TRENDELENBURG, U. (1975):
Molecular geometry and adrenergic drug activity.
Pharmacol. Rev. 26, 323-392

PATON, W.D.M. (1961):
A theory of drug action based on the rate of drug-receptor combination.
Proc. Roy. Soc. B 154, 21-69

PAULING, L., COREY, R.B., BRANSON, H. R. (1951):
The structure of proteins: Two hydrogen - bonded helical configurations of the polypeptide chain.
Proc. Nat. Acad. Sci. 37, 205-211

PEIPER, U., SCHMIDT, E. (1972):
Relaxation of coronary arteries by electromechanical decoupling or adrenergic stimulation.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 337, 107-117

PÖCH, G., KUKOVETZ, W.R. (1972):
Studies on the possible role of cyclic AMP in drug-induced coronary vasodilatation.
Adv. Cycl. Nucl. Res. 1, 195-211

PÖCH, G., UMFAHRER, W. (1976):
Differentiation of intestinal smooth muscle relaxation caused by drugs that inhibit phosphodiesterase.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 293, 257-268

PORTOGHESE, PH.S. (1970):
Relationships between stereostructure and pharmacological activities.
Annu. Rev. Pharmacol. 10, 51-76

REEVES, J.P., SUTKO, J.L. (1980):
Sodium-calcium exchange activity generates a current in cardiac membrane vesicles.
Science 208, 1461-1464

REUTER, H. (1979):
Properties of two inward membrane currents in the heart.
Ann. Rev. Physiol. 41, 413-424

REUTER, H., SCHOLZ, H. (1977):
A study on the ion selectivity and kinetic properties of the calcium dependent slow inward current in mammalian cardiac muscle.
J. Physiol. (London) 264, 17-47

REUTER, H., SEITZ, N. (1968):
The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition.
J. Physiol. (London) 195, 451-470

RODENKIRCHEN, R. (1979):
Inotropic actions of RO 11-1781, a new anti-arrhythmic drug.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 307, R 40

RODENKIRCHEN, R., BAYER, R., MANNHOLD, R. (1980):
Use-dependent actions of Ca-antagonists.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 311, R 34

RODENKIRCHEN, R. BAYER, R., MANNHOLD, R. (1980):
On the stereospecific negative inotropic action of prenylamine.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 313, R 41

RODENKIRCHEN, R., BAYER, R., STEINER, R., BOSSERT, F., MEYER, H., MÖLLER, E. (1979):
Structure-activity studies on nifedipine in isolated cardiac muscle.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 310, 69-78

RODENKIRCHEN, R., MANNHOLD, R., BAYER, R., STEINER, R. (1978):
Correlations between negative inotropic potency and lipophilicity of Ca-antagonists.
In: Proceedings of the 7th Internat. Congr. of Pharmacology, Paris (eds. J.R. Boissier, P. Lechat, J. Fuchelte), p 488, Pergamon Press, Oxford/New York

RODRIGUES-PEREIRA, E., VIANA, A.P. (1968):
The actions of verapamil on experimental arrhythmias.
Arzneim. Forsch. 18, 175-179

ROSEN, M.R., ILVENTO, J.P., GELBAND, H., MERKER, CH. (1974):
Effects of verapamil on electrophysiologic properties of canine cardiac Purkinje fibers.
J. Pharm. Exp. Ther. 189, 414-422

SATO, M., NAGAO, T., YAMAGUCHI, I., NAKAJIMA, H., KIYOMOTO, A. (1971):
Pharmacological studies on a new 1,5-benzothiazepine derivative (CRD-401).
Arzneim. Forsch. 21, 1338-1343

SCHLEPPER, M., THORMANN, J., SCHWARZ, F. (1975):
The pharmacodynamics of orally taken verapamil and verapamil retard as judged by their negative dromotropic effect.
Arzneim. Forsch. 25, 1452-1458

SCHOMERUS, M., SPIEGELHALDER, B., STIEREN, B., EICHELBAUM, M. (1976):
Physiological disposition of verapamil in man.
Cardiovasc. Res. 10, 605-612

SCHÜMANN, H.J., WAGNER, J., SPRINGER, W. (1977):
The influence of calcium antagonists on the maximum inotropic effect and on the toxicity of digoxin and digitoxin in the isolated electrical driven guinea-pig atrium.
Arzneim. Forsch. 27, 2353-2357

SEITZ, G. (1976):
Aromatizität und ihre Bedeutung für das Pharmakon.
Pharm. in uns. Zeit 5, 177-188

SEYDEL, J.K., SCHAPER, K.-J. (1979):
Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen.
Verlag Chemie, Weinheim

SEYDEL, J.K., SCHAPER, K.-J. WEMPE, E., CORDES, H.P. (1976):
Mode of action and quantitative structure-activity correlations of tuberculostatic drugs of the isonicotinic acid hydrazide type.
J. Med. Chem. 19, 483-492

SILVA GRACA, A., VAN ZWIETEN, P.A. (1971):
The influence of iproveratril on calcium movements in isolated heart muscle.
Eur. J. Pharmacol. 15, 137-140

SINGER, S.J., NICOLSON, G.L. (1972):
The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.
Science 173, 720-731

STAAB, H.A. (1970):
Einführung in die theoretische organische Chemie.
4. Auflage. pp. 216
Verlag Chemie, Weinheim

STEPHENSON, R.P. (1956):
A modification of receptor theory.
Br. J. Pharmacol. 11, 379-393

STRICHARTZ, G.R. (1973):
The inhibition of sodium currents in myelinated nerve by quaternary derivatives of lidocaine.
J. Gen. Physiol. 62, 37-57

TADA, M., KIRCHBERGER, M.A., KATZ, A.M. (1975):
Phosphorylation of a 22500 dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine-3'5 - monophosphate - dependent protein kinase.
J. Biol. Chem. 250, 2640-2647

TADA, M., KIRCHBERGER, M.A., REPKE, D.I., KATZ, A.M. (1974):
Stimulation of calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3'5 - monophosphate-dependent protein kinase.
J. Biol. Chem. 249, 6174-6180

TAFT, R.W. jr. (1956):
Separation of polar, steric and resonance effects.
In: Steric Effects in Organic Chemistry (ed. M.S. Newman), J. Wiley & Sons, New York

THORENS, S., HAEUSLER, G. (1979):
Effects of some vasodilators on calcium translocation in intact and fractionated vascular smooth muscle.
Eur. J. Pharmacol. 54, 79-91

TOPLISS, J.G. (1972):
Utilization of operational schemes for analog synthesis in drug design.
J.Med. Chem. 15, 1006-1011

TOPLISS, J.G., COSTELLO, R.J. (1972):
Chance correlation in structure-activity studies using multiple regression analysis.
J. Med. Chem. 15, 1066-1068

TOPLISS, J.G., EDWARDS, R.P. (1979):
Chance factors in studies of quantitative structure-activity relationships.
J. Med. Chem. 22, 1238-1244

TRAUTWEIN, W. (1981):
The mode of action of the calcium antagonists on the calcium channel in mammalian ventricular muscle.
In: Symposium On Calcium Blocking Agents, A Novel Intervention For Treatment Of Cardiac Disease Abstracts Of The Satellite Symposium To The VIII International Congress Of Pharmacology

TRETTIN, D. (1977):
Quantitative Struktur-Pharmakokinetikbeziehungen am Beispiel von Sulfanilamidobenzolen und Sulfanilamidopyridinen.
Disseration, Universität Kiel

TRIGGLE, C.R. (1980):
Site of action of D 600 in guinea-pig ileal longitudinal smooth muscle.
J. Physiol. 306, 106 P

TRIGGLE, D.J., SWAMY, V.C. (1980):
Pharmacology of agents that effect calcium. Agonists and Antagonists.
Chest Suppl. 78, 174-179

TRITTHART, H., KAUFMANN, R., VOLKMER, H.P., BAYER, R., KRAUSE, H. (1973):
Ca-movement controlling myocardial contractility
I. Voltage-, current- und time-dependence of mechanical activity under voltage clamp conditions (cat papillary muscles and trabeculae).
Pflügers Arch. ges. Physiol. 338, 207-231

TUTE, M. (1971):
Principles and practice of Hansch-analysis: a guide to structure-activity correlation for the medicinal chemist.
Adv. Drug Res. 6, 1-77

ULBRICHT, W. (1974):
Drugs to explore the ionic channels in the axon membrane.
In: Biochemisty of Sensory Functions (L. Jaenicke, ed.)
Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

VAN MEEL, J.C.A., DE JONGE, A., KALKMAN, H.O., WILFFERT, B., TIMMERMANS, P.B.M.W.M., VAN ZWIETEN, P.A. (1980):
Organic and inorganic calcium antagonists reduce vasoconstriction in vivo mediated by postsynaptic α_2 - adrenoceptors.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 316, 288-293

VAN NUEHN, J.M., VAN HOUTTE, P.M. (1980):
Improvement of tissue perfusion with inhibitors of calcium ion influx.
Biochem. Pharmacol. 29, 479-481

VARGA, E., NADOR, K. (1968):
Die heutige Auffassung vom Begriff des aromatischen Charakters und seine Bedeutung für die Arzneimittelforschung.
Arzneim. Forsch. 18, 633-645

VATER, W., KRONEBERG, G., HOFFMEISTER, F., KALLER, H., MENG, K., OBERDORF, A., PULS, W., SCHLOSSMANN, K., STOEPEL, K. (1972):
Zur Pharmakologie von 4-(2 -Nitrophenyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarbonsäure-dimethylester (nifedipine), BAY a 1040.
Arzneim. Forsch. 22, 1-14

VERLOOP, A., HOOGENSTRAATEN, W., TIPKER, J. (1976):
Development and application of new steric substituent parameters in drug design.
In: Drug Design, Vol. 7 (E.J. Ariens ed.) pp. 165-207, Academic Press, New York

VOGEL, S., CRAMPTON, R., SPERELAKIS, N. (1979):
Blockade of myocardial slow channels by Bepridil (CERM - 1978).
J. Pharm. Exp. Ther. 210, 378-385

WALSH, M.P., LE PEUCH, CH. J., VALLET, B., CAVADORE, J.-C., DEMAILLE, J.G. (1980):
Cardiac calmodulin and its role in the regulation of metabolism and contraction.
J. Moll. Cell. Cardiol. 12, 1091-1101

WEBER, A. (1971 a):
Regulatory mechanisms of the calcium transport system of fragmented rabbit sarcoplasmic reticulum.
I. The effect of accumulated calcium on transport and adenosine-triphosphate hydrolysis.
J. Gen. Physiol. 57, 50-63

WEBER, A. (1971 b):
Regulatory mechanisms of the calcium transport system of fragemented rabbit sarcoplasmic reticulum.
II. Inhibition of outflux in calcium-free media.
J. Gen. Physiol. 57, 64-78

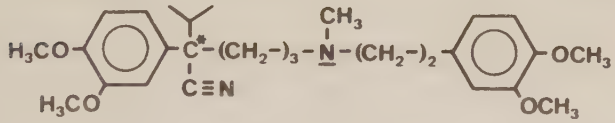
WINEGRAD, S. (1965):
Autoradiographic studies of intracellular calcium in frog skeletal muscle.
J. Gen. Physiol. 48, 455-479

WINEGRAD, S. (1968):
Intracellular calcium movements of frog skeletal muscle during recovery from tetanus.
J. Gen. Physiol. 51, 65-83

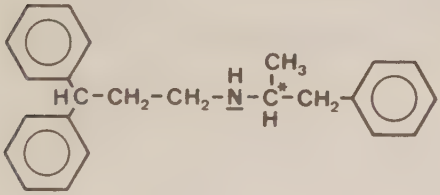
7. ANHANG

7.1. CA-ANTAGONISTEN UND STRUKTURVERWANDTE PHARMAKA

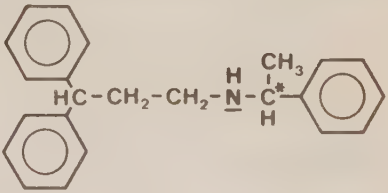
VERAPAMIL



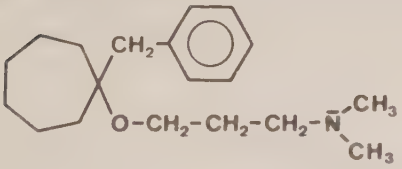
PRENYLAMIN



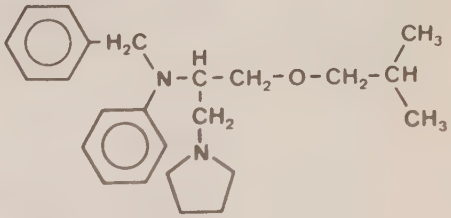
FENDILIN



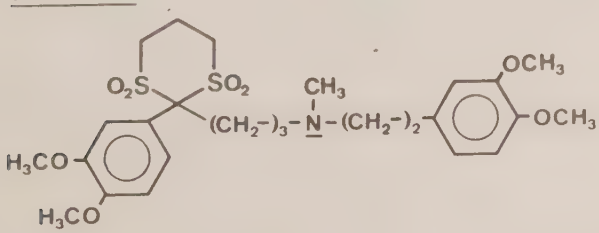
BENCYCLAN



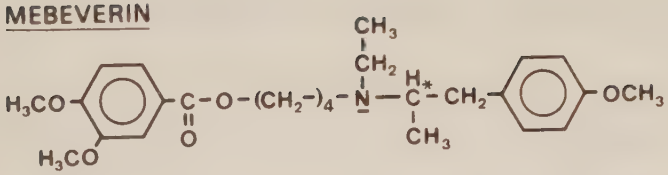
BEPRIDIL



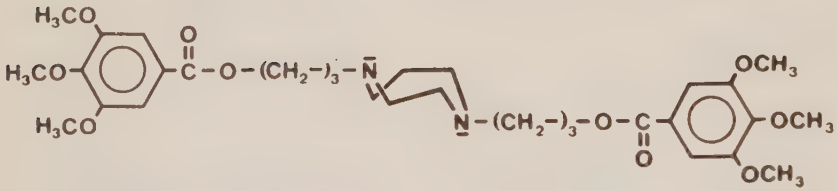
TIAPAMIL



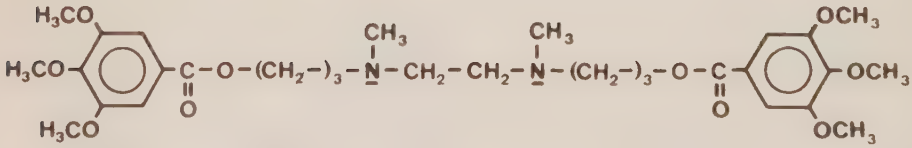
MEBEVERIN



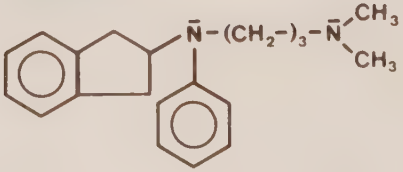
DILAZEP



HEXOBENDIN



APRINDIN



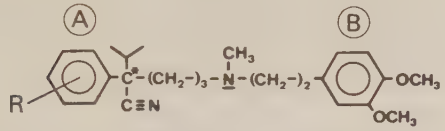
VERAPAMIL 5-[N-(3,4-Dimethoxy-phenethyl)-N-methyl-amino]-2-(3,4-dimethoxy-phenyl)-2-isopropyl-valeronitril
PRENYLAMIN N-(1-Methyl-phenethyl)-3,3-diphenylpropylamin
FENDILIN N-(1-Phenyl-ethyl)-3,3-diphenylpropylamin
BENCYCLAN N-[3-(1-Benzyl-cycloheptyl-oxy-propyl]-N,N-dimethylamin
BEPRIDIL 1-[3-Isobutoxy-2-(benzylphenyl)-amino]-propylpyrrolidin
TIAPAMIL N-(3,4-Dimethoxyphenethyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-N-methyl-m-dithian-2-propylamin-1,1,3,3-tetraoxid
MEBEVERIN 3,4-Dimethoxybenzoesäure-(4-[ethyl-(p-methoxy-α-methyl-phenethyl)-amino]-butylester
DILAZEP 1,4-Bis-[3-(3,4,5-trimethoxybenzoyl-oxy)-propyl]-perhydro-1,4-diazepin
HEXOBENDIN N,N'-Dimethyl-N,N'-bis-[3-(3,4,5-trimethoxybenzoyloxy)-propyl]-ethylendiamin
APRINDIN N-[3-(Diethylamino)-propyl]-N-phenyl-2-indanamin

Verbindung	Summenformel Base	MG Base	Summenformel Salz	MG Salz
Verapamil hydrochlorid	$C_{27}H_{38}O_4N_2$	454.62	$C_{27}H_{39}O_4N_2Cl$	491.1
Prenylamin laktat	$C_{24}H_{27}N$	329.49	$C_{27}H_{33}O_3N$	419.59
Fendilin hydrochlorid	$C_{23}H_{25}N$	315.46	$C_{23}H_{26}NCl$	351.92
Bencyclan hydrogenfumarat	$C_{19}H_{31}ON$	289.46	$C_{23}H_{35}O_5N$	405.54
Bepridil hydrochlorid	$C_{24}H_{34}ON_2$	366.55	$C_{24}H_{35}ON_2Cl$	401.99
Tiapamil hydrochlorid	$C_{26}H_{37}O_8NS_2$	555.70	$C_{26}H_{38}O_8NS_2Cl$	592.17
Mebeverin hydrochlorid	$C_{25}H_{35}O_5N$	429.56	$C_{25}H_{36}O_5NCl$	466.02
Dilazep 2-hydrochlorid	$C_{31}H_{44}O_{10}N_2$	604.70	$C_{31}H_{46}O_{10}N_2Cl_2$	677.62
Hexobendin 2-hydrochlorid	$C_{30}H_{44}O_{10}N_2$	592.69	$C_{30}H_{46}O_{10}N_2Cl_2$	665.61
Aprindin hydrochlorid	$C_{22}H_{30}N_2$	322.5	$C_{22}H_{31}N_2Cl$	358.96

7.2. VERAPAMILDERIVATE

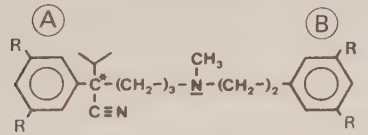
7.2.1. Ringabwandlungsprodukte

Gruppe I: Abwandlungen an Ring A



R =	Verbindung
3,4 - OCH_3	Verapamil
3,4,5 - OCH_3	D 600
4 - OCH_3	D 557
2,6 - OCH_3	D 846
3-OCH_3, 4-OH	PR 23
3,4 - Cl	D 595
3 - CF_3	T 13
4 - F	Sz 48
3,4 - CH_3	D 559
4 - $C(CH_3)_3$	Sz 51

Gruppe II: Symmetrische Alkoxylierung an beiden Ringen (A + B)

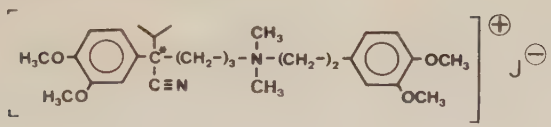


R =	Verbindung
H	Sz 45
OCH_3	D 784
OC_2H_5	D 894
O_n-C_3H_7	F 3
O_i-C_3H_7	F 8
O_n-C_4H_9	Sz 117

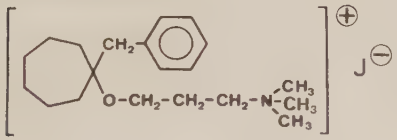
Verbindung	Salz	Summenformel	MG
Verapamil	Cl	$C_{27}H_{39}O_4N_2Cl$	491.1
D 600	Cl	$C_{28}H_{41}O_5N_2Cl$	521.1
D 557	Cl	$C_{26}H_{37}O_3N_2Cl$	461.1
D 846	Cl	$C_{27}H_{39}O_4N_2Cl$	491.1
PR 23	Cl	$C_{26}H_{37}O_4N_2Cl$	477.1
D 595	Cl	$C_{25}H_{33}O_2N_2Cl_3$	499.9
T 13	$H_2N\text{-}HO_3S$	$C_{26}H_{36}O_5N_3SF_3$	559.7
Sz 48	Cl	$C_{25}H_{34}O_2N_2FCl$	449.0
D 559	Cl	$C_{27}H_{39}O_2N_2Cl$	459.1
Sz 51	Cl	$C_{29}H_{43}O_2N_2Cl$	487.1
Sz 45	Cl	$C_{23}H_{31}N_2Cl$	371.0
D 784	Cl	$C_{27}H_{39}O_4N_2Cl$	491.1
D 894	Cl	$C_{31}H_{47}O_4N_2Cl$	547.2
F 3	$H_2N\text{-}HO_3S$	$C_{35}H_{57}O_7N_3S$	663.9
F 8	$H_2N\text{-}HO_3S$	$C_{35}H_{57}O_7N_3S$	663.9
Sz 117	$H_2N\text{-}HO_3S$	$C_{39}H_{65}O_7N_3S$	720.0

7.3. QUATERNISIERUNGSPRODUKTE

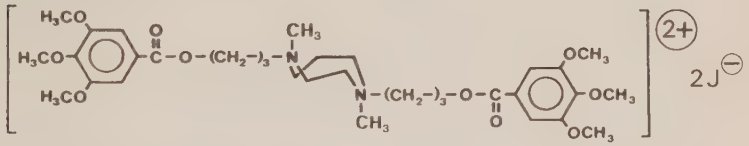
VERAPAMIL JODID (H 1)



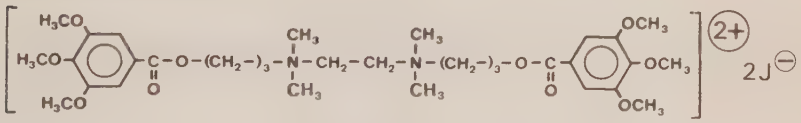
BENCYCLAN JODID



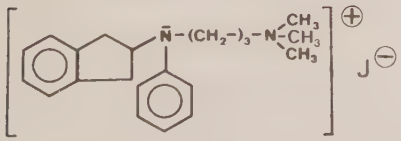
DILAZEP JODID



HEXOBENDIN JODID



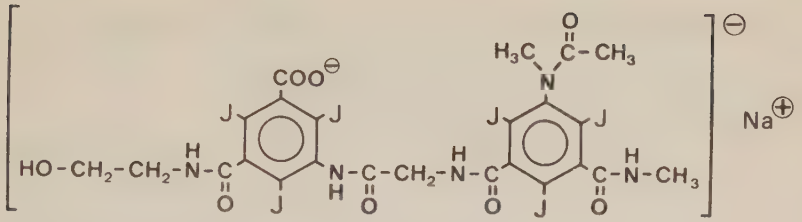
APRINDIN JODID



Verbindung	Summenformel	MG
Verapamil Jodid (H 1)	$C_{28}H_{41}O_4N_2J$	596.6
Bencyclan Jodid	$C_{20}H_{34}ONJ$	431.4
Dilazep Jodid	$C_{33}H_{50}O_{10}N_2J_2$	888.6
Hexobendin Jodid	$C_{32}H_{50}O_{10}N_2J_2$	876.6
Aprindin Jodid	$C_{23}H_{34}N_2J$	465.4

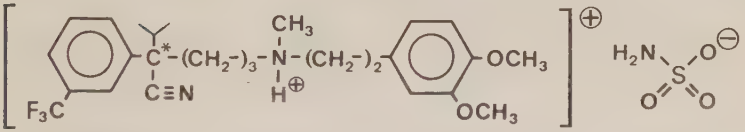
7.4. VERBINDUNGEN FÜR DIE LAMMA-ANALYSE

IOXAGLINSÄURE



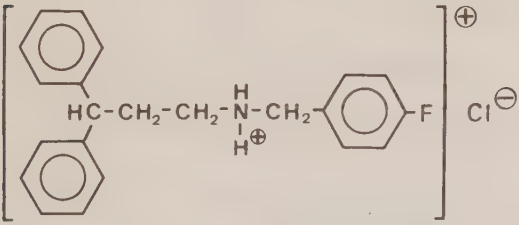
$C_{24}H_{20}O_8N_5J_6Na$ MG: 1290.8

T 13



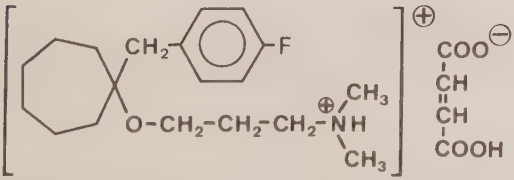
$C_{26}H_{36}O_5N_3SF_3$ MG: 559.65

Th 1055



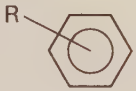
$C_{22}H_{22}NFCl$ MG: 355.89

Th 250



$C_{23}H_{24}O_5NF$ MG: 423.52

7.5. BENZOLDERIVATE



R =	Verbindung	Summenformel	M G
1,2 - OCH_3	Veratrol	$C_8H_{10}O_2$	138.17
1,2,3 - OCH_3	1,2,3-Trimethoxy-benzol	$C_9H_{12}O_3$	168.19
- OCH_3	Anisol	C_7H_8O	108.14
1-OCH_3, 2-OH	Guajakol	$C_7H_8O_2$	124.14
1,2 - Cl	1,2-Dichlorbenzol	$C_6H_4Cl_2$	147.00
- CF_3	Benzotrifluorid	$C_7H_5F_3$	146.11
- F	Fluorbenzol	C_6H_5F	96.11
1,2 - CH_3	o-Xylol	C_8H_{10}	106.17
- $C(CH_3)_3$	tert.-Butylbenzol	$C_{10}H_{14}$	134.22

L E B E N S L A U F

I. Persönliche Daten

10.3.1948	geboren in Haltern/Westfalen als Sohn des Apothekers Kurt Mannhold und der Apothekerin Toni Mannhold, geb. Lienkamp
seit 1.8.1973	verheiratet mit Barbara Matt
14.9.1978	Geburt der Tochter Marion

II. Schulzeit und Studium

1954 - 1959	Volksschule in Hagen
1959 - 1967	Schalker Gymnasium in Gelsenkirchen
7.7.1967	Abitur
1967 - 1969	Apothekenpraktikum in der Westfalen-Apotheke, Bochum
2.9.1969	Pharmazeutische Vorprüfung, Arnsberg Note: gut
SS 1970 - SS 1973	Pharmaziestudium an der Johann Wolfgang von Goethe Universität, Frankfurt/M.
16.7.1973	Pharmazeutische Prüfung, Note: gut

III. Wissenschaftlicher Werdegang

seit 1.10.1973	Doktorand am Lehrstuhl für Klinische Physiologie der Universität Düsseldorf bei Prof. Dr. Raimund Kaufmann
11.7.1977	Promotion zum Dr. rer. nat., Note: cum laude. Thema der Dissertation: Untersuchungen zum kalziumantagonistischen Wirkungsmechanismus und zur Struktur-Wirkungsbeziehung von Verapamil
7.9.1978	Ernennung zum Wissenschaftlichen Assistenten
2.12.1982	Habilitation für das Fach Physiologie an der Universität Düsseldorf
20.1.1983	Erteilung der Venia Legendi